VYTAUTAS RANČELIS

Genetika

VYTAUTAS RANČELIS

Genetika

LIETUVOS MOKSLŲ AKADEMIJOS LEIDYKLA
Vilnius 2000

UDK 575 (075.08)
Ra-185

2000 05 30 Nr. 05A-10 Aukštųjų mokyklų bendrųjų vadovėlių leidybos komisijos rekomenduota. Išleista Švietimo ir mokslo ministerijos lėšomis
Rankraštis parengtas remiant Valstybiniam mokslo ir studijų fondui

Recenzentas prof. A. SINKUS

D.150.110

ISBN 9986-08-033-9

© Vytautas Rančelis, 2000

TURINYS

PRATARMĖ 8

I. GENETIKA – MOKSLAS APIE PAVELDIMUMĄ IR KINTAMUMĄ 10

1.1. Pagrindinės genetikos problemos 10
1.2. Trumpa genetikos istorijos apžvalga 15
1.2.1. Pirmosios paveldimumo ir kintamumo hipotezės 16
1.2.2. Genetika – XX a. mokslas 22
1.3.1. Genetika Lietuvoje 28
1.4.1. Genetikos metodai 33
1.5.1. Genetikos mokslo reikšmė 45

A. GENOMAS 46

II. DNR – GENETINĖ MEDŽIAGA. GENO SANDARA IR VEIKIMAS 46

2.1. DNR – genetinė medžiaga ir genetinis kodas 46
2.1.1. Genetinio kodo hipotezė ir kodonas 48
2.1.2. Genetinio kodo išaiškinimas ir patikrinimas biocheminiais metodais ... 54
2.1.3. Kodo patikrinimas genetiniais metodais 56
2.1.4. Bendras genetinio kodo apibūdinimas 61
2.1.5. Genetinio kodo nevienareikšmiškumas. Genomo strategija 66
2.2. Genas 72
2.2.1. Genų simboliai 72
2.2.2. Funkcinis geno dalomumas ir alelizmas 73
2.2.3. Tarpalelinė komplementacija ir polifunkciniai baltymai 80
2.3. Geno sandara ir veikla 86
2.3.1. Transkripcija (RNR biosintezė). Reguliacinės-akceptorinės geno dalies sandara 88
2.3.2. Transkripto brendimas. Splaisingas. Introninė-egzoninė eukariotų genų sandara 93
2.3.3. Transliacija. Baltymo sintezė. Transliuojamosios geno dalies sandara ... 101
2.4. DNR replikacija 105
2.4.1. DNR replikacijos įrodymai ir su jais susiję DNR tyrimo metodai. Pusiau konservatyvi DNR sintezė 105
2.4.2. DNR replikacijos eiga 109
2.4.3. DNR molekulinė hibridizacija, molekuliniai zondai ir polimerazinė grandininė reakcija 115

III. GENOMO SANDARA IR VEIKLA 119

3.1. Prokariotai ir eukariotai. Genomo evoliucija 119

3.2. Bendras genomo sandaros apibūdinimas ... 126
3.3. Kartotinės sekos ... 133
3.4. Judrieji genomo elementai ... 140
3.5. Chromosoma ... 146
3.5.1. Molekulinė chromosomos sandara ... 146
3.5.2. Eukariotų chromosomų morfologija. Kariotipas, rūšinis jo savitumas. Heterochromatinas ir specifinės sandaros bei paskirties chromosomos ... 153
3.5.3. Specialiosios chromosomos dalys ... 160
3.5.3.1. Telomeros ... 160
3.5.3.2. Centromeros. ARS ... 168
3.5.3.3. Dirbtinės chromosomos. Eukariotų genų klonavimas ir genomo bibliotekos ... 172
3.6. Somatinių ląstelių genomo ypatumai ... 174
3.7. Epigenetiniai genomo pokyčiai ir paveldimumas ... 181
3.7.1. Genomo imprintingas ... 182
3.7.1.1. Genomo imprintingo tyrimo metodai ir įrodymas ... 183
3.7.1.2. Genomo imprintingas ir alelinių genų veiklos ypatumai. Imprintingo esmė ... 188
3.7.2. X chromosomos inaktyvinimas. Dozės kompensacija ... 193
3.7.3. Paramutacijos. Ilgalaikės modifikacijos ... 199
3.8. Genomo pertvarka ... 203
3.8.1. Viso genomo pertvarka ir jo pertvarka pirmuonių vegetatyvinių ląstelių branduoliuose ... 203
3.8.2. Pavienių genų skaičiaus pokyčiai – amplifikacija. Prisitaikymas prie toksinų ir kitokių veiksnių ... 208
3.8.3. Lokusų vietos kaita. Somatinis krosingoveris. Mielių poravimosi tipai ... 215
3.9. Nebranduoliniai (nechromosominiai) genomai. Nebranduolinis paveldimumas ... 222
3.9.1. Specifiniai nebranduolinio paveldimumo tyrimo metodai ... 223
3.9.2. Eukariotų ląstelės organoidų genomai ... 231
3.9.2.1. Mitochondrijų genomas ... 231
3.9.2.2. Plastidžių (chloroplastų) genomas ... 235
3.9.3. Plazmidės – nechromosominės genetinės bakterijų struktūros, jų įvairovė. Plazmidės kaip vektoriai genų inžinerijoje ... 237
3.9.4. Parazitizmas, simbiozė ar natūralūs ląstelės komponentai? ... 245
3.9.5. Nebranduolinio paveldimumo pasireiškimo būdai. Netradicinės genetinės struktūros (prionai, viroidai, supermatricos) ... 247
3.10. Genomo tyrimo metodai ... 256
3.10.1. Genomo tyrimo metodai ir chromosomų genolapiai ... 256
3.10.2. Žmogaus chromosomų kartografavimas. Restrikciniai genolapiai ... 262
3.10.3. Genomo bibliotekos. DNR sekvenavimas ... 266

IV. GENŲ VEIKLOS VALDYMAS. GENŲ GRUPĖS ... 271

4.1. Operonas. *Lac* operonas ... 271
4.2. Hemoglobino genų sankaupos ir jų evoliucija ... 279
4.3. Imunogenetika. Imuniteto genai, jų pertvarka ir valdymas ... 283

4.3.1. Bendras apibūdinimas ir imuniteto genų evoliucija ... 283
4.3.2. Imunoglobulinų genų populiacija ir rekombinacija somatinėse ląstelėse ... 288
4.3.3. T limfocitų receptoriaus (TCR) ir audinių suderinamumo (MHC) genai ... 296
4.4. Citochromų P-450 genų populiacija. Ksenobiotikų biodegradacijos genetika ... 303
4.4.1. Ksenobiotikų biodegradacija ir jos fazės. Citochromai P-450 ir jų genai ... 303
4.4.2. Citochromų P-450 genų valdymo ypatumai. Lytinis dimorfizmas ir imprintingas ... 309
4.5. GENŲ VEIKLOS VALDYMAS ... 316
4.5.1. Cis- ir trans-veiksniai. Regulonas ... 316
4.5.2. Genų veiklos valdymo etapai (apžvalga) ... 321
4.5.2.1. Genomo sandara ir genų veiklos valdymas ... 321
4.5.2.2. Chromatino sandara ir genų veiklos valdymas ... 324
4.5.2.3. Genų veiklos valdymas vykstant transkripcijai ir po transkripcijos ... 327
4.6. Ląstelės ciklo valdymas ... 331
4.7. Vėžio genetika. Nereglamentuotas diferencijuotų somatinių ląstelių dalijimasis ... 339
4.7.1. Mutacinė ir virusinė vėžio teorijos. Onkogenai ... 339
4.7.2. Vėžio supresoriai. Vėžys – laipsniško mutacijų kaupimosi pasekmė ... 343
4.8. Genų evoliucija/lyginamoji genetika ... 347

V. RAIDOS (ONTO-MORFO-) GENETIKA ... 352

5.1. Determinacija ... 352
5.1.1. Determinacija ir diferenciacija. Transdeterminacija. Totipotenciškumo problema ... 352
5.1.2. Determinacijos laikas ir vieta. Morfogenai ... 358
5.1.3. Pozicinė determinacija ... 365
5.2. Morfogenezės/ontogenezės genai ... 367
5.2.1. Ankstyvieji nematodo *Caenorhabditis elegans* genai. Nematodo morfo- ir ontogenetika ... 367
5.2.2. Ankstyvieji drozofilos bendrojo plano ir segmentacijos genai ... 371
5.2.2.1. Motininiai genai ir jų veikla ... 371
5.2.2.2. Drozofilos segmentacijos ir homeoziniai genai. HOM kompleksas ... 374
5.2.3. Morfogenezės genų veikla. HOX genai žmogaus/žinduolių ir kitų organizmų genome ... 377
5.3. Lyties genetika ... 382

B. MUTACINIS KINTAMUMAS ... 393

VI. MUTACIJOS ... 393

6.1. Bendras mutacijų apibūdinimas ... 394
6.2. Generatyvinės ir somatinės, tiesioginės ir grįžtamosios mutacijos ... 396
6.3. Mutacijų grupės pagal genotipo pokyčius (bendra apžvalga) ... 398
6.3.1. Genomo mutacijos ... 400

6.3.1.1. Autopoliploidija ... 400
6.3.1.2. Alopoliploidija. Tolimoji lytinė hibridizacija. Somatinių ląstelių hibridizacija ... 406
6.3.1.3. Haploidai ... 415
6.3.1.4. Aneuploidija (heteroploidija) ... 420
6.3.2. Chromosomų mutacijos ... 427
6.3.3. Genų mutacijos ... 436

VII. MUTAGENEZĖ. GENOTOKSIKOLOGIJA ... 447

7.1. Mutagenai ir teratogenai. Bendra samprata ... 447
7.2. Fiziniai mutagenai ... 449
7.2.1. Mutageninis jonizuojančiosios spinduliuotės poveikis. Priklausomybė nuo dozės ... 449
7.2.2. Mutageninio jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio priežastys ... 455
7.2.3. Ultravioletinė spinduliuotė. Kiti fiziniai mutagenai ... 459
7.3. Cheminiai mutagenai ... 463
7.3.1. Cheminiai mutagenai, susidarantys po įvairių sąveikų ... 465
7.3.2. Laisvaradikalinė mutagenezė. Ligos, kurioms būdinga sutrikusi laisvųjų radikalų pusiausvyra ... 469
7.3.3. Biologiniai mutagenai. Topoizomerazinė ir insercinė (įterptinė) mutagenezė ... 474
7.3.4. Aplinkos mutagenai, jų įvertinimo problemos ... 477
7.3.4.1. Aplinkos mutagenų ypatybės ir genotoksiškumo įvertinimas ... 477
7.3.4.2. Naujų mutacijų aptikimo metodai ... 483
7.4. Mutagenų pradinio veikimo mechanizmai. Potencialios DNR pažaidos ... 490
7.5. Antimutagenezė ir DNR reparacija ... 497
7.5.1. Mutagenezės etapai ir antimutagenezė. Mutagenų taikiniai ... 497
7.5.2. DNR pažaidų reparacija ... 501
7.5.2.1. DNR pažaidų reparacijos apibūdinimas ir tipai ... 501
7.5.2.2. Tiesioginė DNR pažaidų reparacija. Ekscizinė reparacija ... 504
7.5.2.3. Indukuota DNR pažaidų reparacija. Atsakai ... 510
7.5.2.4. Nesuporuotų nukleotidų reparacija. Žmogaus DNR reparacijos defektai ... 515
7.6. Dirbtinis ir gamtinis mutagenezės valdymas ... 521
7.6.1. Mutagenų veikimo savitumas ... 523
7.6.2. Gamtinis mutagenezės valdymas. Genetinis nestabilumas. Genai-mutatoriai ir antimutatoriai ... 525
7.7. Morfozės ir teratogenai. Genotrofai. „Įgytų požymių" paveldėjimo klausimas ... 530

C. POŽYMIŲ PAVELDĖJIMAS IR REKOMBINACIJA ... 537

VIII. BAKTERIJŲ IR VIRUSŲ GENETIKA ... 537

8.1. Bakterijos ... 537
8.2. Virusai ... 547

IX. EUKARIOTŲ POŽYMIŲ PAVELDĖJIMAS IR REKOMBINACIJA ... 556

9.1. DNR kopijų paskirstymas. Mitozės tipai ... 556
9.1.2. Mejozė. Homologinių chromosomų konjugacija ... 564
9.3. Požymių paveldėjimas ir diploidiškumas ... 572
9.3.1. Vienos chromosomų/genų poros paveldėjimas ... 572
9.3.2. Lytinėse chromosomose esančių genų paveldėjimas ... 578
9.4. Eukariotų genomo fragmentacija į chromosomas ir genų/požymių paveldėjimas ... 582
9.4.1. Nealeliniai genai – nehomologinėse chromosomose. Nepriklausomas požymių paveldėjimas ... 584
9.4.2. Paveldėjimas, kai genai yra vienoje chromosomoje. Genų sankiba ... 591
9.4.3. Krosingoveris ... 594
9.4.4. Netipiškas eukariotų požymių paveldėjimas ... 599
9.5. Genų sąveika ... 605
9.5.1. Alelinių genų sąveika ... 605
9.5.1.1. Alelinių genų sąveikos tipai ir priklausomybė nuo įvairių veiksnių ... 605
9.5.1.2. Alelinių genų sąveikos priežastys ... 610
9.5.2. Nealelinių genų sąveika ... 618
9.5.2.1. Genai modifikatoriai. Epistaziniai genai ... 619
9.5.2.2. Suminės nealelinių genų sąveikos ... 621
9.6. Paveldimumas ir aplinka ... 631
9.7. Žemesniųjų eukariotų požymių paveldėjimas ir rekombinacija ... 635

X. GENETINĖS REKOMBINACIJOS MECHANIZMAI. GENŲ INŽINERIJA ... 642

10.1. Molekuliniai rekombinacijos mechanizmai ... 642
10.1.1. Rekombinacijos tipai. Saitspecifinė rekombinacija ... 642
10.1.2. Homologinė rekombinacija ... 644
10.2. Genų inžinerija ... 652

LITERATŪRA ... 660

PRATARMĖ

Genetika tiria vieną iš pagrindinių gyvų organizmų savybių – **paveldimumą**, todėl ji savaime atsiduria visų biologinių reiškinių centre. Bent taip turėtų būti. Vis dar atsiliepia didelis biologijos susiskaidymas pagal tiriamąsias problemas. Iš dalies tai neišvengiama.

Tačiau per pastaruosius 10–15 metų genetika padarė tokį didelį šuolį, kad įvairios tą pačią organizmų grupę tiriančios mokslo šakos savaime susilieja į vieną bendrą mokslą apie augalus, grybus, gyvūnus, žmogų. Antra vertus, yra bendri genetiniai reiškiniai, būtinas jų lyginimas įvairiose organizmų grupėse (lyginamoji genetika), todėl išlieka ir bendroji genetika.

Skaitytojas, pradėjęs skaityti šią knygą, bus nustebintas, o galbūt net šokiruotas neradęs pradžioje Mendelio dėsnių. Per laikotarpį, praėjusį nuo pirmosios „Bendrosios genetikos" laidos (1986), genetikos mokslo turinys labai pasikeitė, todėl būtina pradėti dėstymą nuo DNR kaip genetinės medžiagos ir toliau aiškinti, kaip sudarytas genomas ir genas, kaip jie veikia ir valdomi. Be to, yra ir kitokių priežasčių taip elgtis. Pirma, reiškiniai, į kuriuos pripratome žiūrėti kaip į paprastus (netgi prastus – būna ir taip) yra patys sudėtingiausi.

Antra, „C" dalyje dėstomos mintys pirmiausia žinotinos kiekvienam žmogui. Tai žinios apie mus pačius, nes pagrindinis dėmesys knygoje skiriamas eukariotams – žinduoliams – žmogui.

Tačiau atsižvelgta į tai, kad kiekviena aukštoji mokykla turi savą „Genetikos" kurso programą, o kiti skaitytojai – savo specifinius žinių iš genetikos poreikius. Kiekvienas skyrius parašytas taip, kad būtų gana savarankiškas, todėl galima skaityti ir nuo galo, jeigu to reikia. Mat knyga skirta ne tik studentams, bet ir įvairių krypčių biologams, biologijos mokytojams, medikams, žemės ūkio specialistams. Nuo aukštojo mokslo studijų praeina didesnis ar mažesnis laiko tarpas, todėl suprantamas kiekvieno poreikis papildyti savo žinias.

Dar vienas klausimas, būtinas aptarti „Pratarmėje". Tai terminai. Genetikoje pilna angliškos kilmės žodžių. Lietuviškų terminų, ypač plataus vartojimo, kūrimas – sveikintinas reiškinys, tačiau knyga skiriama ne mokiniams, o specialistams (būsimiesiems ir esamiems). Todėl autorius laikėsi kompromiso: kur galima, – versti žodžius, kitais atvejais šalia lietuviškų pateikti angliškus (ar kitokios kilmės) terminus, kad skaitytojui būtų lengviau orientuotis.

Knyga suskirstyta į 3 dalis: A. Genomas, B. Mutacinis kintamumas, C. Požymių paveldėjimas ir rekombinacija.

Ypač daug dėmesio skirta genotoksikologijai, kurios problemos kituose vadovėliuose nedėstomos arba dėstomos labai glaustai, nors šioje srityje dirbama labai daug ir ji yra labai svarbi žmonijai, taigi ir Lietuvos gyventojams.

Laikantis kurso programos, nagrinėjami specialūs genetikos klausimai, sudarantys atskiras genetikos sritis, pavyzdžiui, lyties genetika, žmogaus ir medicininė genetika, raidos genetika, imunogenetika, taip pat genetiniai selekcijos pagrindai. Tačiau šios temos nagrinėjamos tuose bendrosios genetikos skyriuose, kuriuose dėstomi teoriniai dalykai ir kurie sudaro šiuolaikinį teorinį atitinkamų taikomosios genetikos sričių pamatą. Tuo pabrėžiama, kad: a) aktuali teorija visuomet plačiai taikoma praktikoje; b) nesuprantant teorinės problemos, neįmanoma jos veiksmingai taikyti praktiškai; c) taikomosios genetikos metodai kuriami remiantis naujais teoriniais laimėjimais; d) daug teorinių problemų praktiškai dar neįdiegta, bet tai netolimos ateities dalykas.

Autorius dėkoja Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui, parėmusiam knygos rengimą, knygos recenzentui prof. A. Sinkui, kolegoms prof. B. Juodkai, prof. R. Lekevičiui, prof. J. Lazutkai, habil. dr. K. Sasnauskui, doc. K. Žukui, doc. D. Žvingilai už vertingus patarimus ir pastabas, G. Gudonienei ir Z. Petuchauskienei, paskatinusioms parengti šią knygą, ir ypač E. Česnienei, J. Patamsytei, D. Abraitytei, be kurių pagalbos šios knygos tekstai ir paveikslai nebūtų parengti.

I. GENETIKA – MOKSLAS APIE PAVELDIMUMĄ IR KINTAMUMĄ

1.1. Pagrindinės genetikos problemos

Nors genetika yra palyginti jaunas mokslas, XX a. „kūdikis", bet ji užima centrinę padėtį tarp kitų biologijos mokslų, vienija biologijos mokslus į visumą. Taip yra dėl genetikos tiriamų problemų svarbos. Vieniems genetika – mokslas apie paveldimumą ir kintamumą, kitiems – apie genus, DNR grandinės atkarpas, lemiančias organizmo požymius, įvairiausias ypatybes, procesus, kurie vyksta organizme. Bendra taisyklė yra tokia:

viską organizme lemia genai.

Tačiau matysime, kad visų genetikos reiškinių į „geno rėmus" sutalpinti negalima, todėl senasis genetikos mokslo apibrėžimas, kad tai mokslas apie paveldimumą ir kintamumą, geriausiai apibūdina šį mokslą. Pats mokslo pavadinimas buvo pasiūlytas anglų mokslininko Beitsono (W. Bateson) 1906 m. ir reiškia mokslą apie kilmę (gr. *genesis* – kilmė).

Paveldimumas yra organizmų gebėjimas perduoti palikuonims savo požymius ir individualios raidos savitumus. Tai bendra organizmų savybė, kuri būdinga absoliučiai visiems organizmams, tarp jų ir žmogui. Paveldimi organizme vykstantys procesai, organizmo požymiai ir savybės, jo santykis su kitais organizmais ir aplinka, net gebėjimas kisti. Dėl šios organizmų savybės vaikai yra panašūs į tėvus. Tai įstabiausia gyvų padarų savybė, dėl kurios organizmams dauginantis atsiranda nenutrūkstama naujų individų kartų grandinė, atsinaujina ir palaikomos organizmų rūšys ir formos. Prie to esame tiek įpratę, kad visai nesistebime, jog nauji individai yra panašūs į savo tėvus ir kitus protėvius.

Tačiau ar ne stebuklas, kad iš vienos ląstelės, pvz., žmogaus, išsivysto sudėtingas organizmas su daugybe specialių organų, audinių? Visi jie puikiai tarpusavyje suderinti, veikia tikslingai, net turi funkcijų „atsargą", skirtą kraštutinėms aplinkybėms, kurios ne visada numatytos. Naujasis individas yra panašus į savo tėvus. Kas lemia šį stebuklą ir kaip vyksta genetinės informacijos, genų perdavimas iš kartos į kartą, kaip pagaliau informacija, esanti genuose, virsta konkrečiais požymiais, – visa tai yra **pagrindiniai genetikos uždaviniai.**

Paveldėjimas yra požymių perdavimo palikuonims būdas. Paveldimi ne požymiai, bet genai. Tačiau požymis, ypač sudėtingesnių organizmų yra sudėtingų sąveikų tarp įvairių genų ir tarp genų bei aplinkos veiksnių rezultatas. **Požymio genetikoje** svarbu išsiaiškinti ne tik genus, kurie lemia požymį, bet ir visą kelią „genas – požymis", todėl skiriama atskirų požymių, kaip antai fotosintezės, izofermentų, antocianų sintezės, atsparumo konkrečioms infekcinėms ligoms ir kt., genetika.

Požymių paveldėjimo būdas tiesiogiai priklauso nuo organizmų genetinės medžiagos struktūros ir dauginimosi ypatumų. Būtent dėl šios priežasties genetikoje ypač ryški objekto reikšmė.

Pirma, kiekvienas objektas, taksonominės ir kitokios organizmų grupės turi specifinių, tik jam/joms būdingų paveldėjimo ir kintamumo ypatumų, kuriuos lemia genetinių struktūrų ypatumai, genetinės medžiagos paskirstymo dukterinėms ląstelėms ir keitimosi tarp organizmų (rekombinacijos) būdai, dauginimosi ypatumai. Tai lemia genetikos susiskaidymą į šakas pagal organizmų grupes arba atskirus organizmus: eukariotų ir prokariotų, mikroorganizmų, augalų arba gyvūnų, virusų, bakterijų ir kt., pagaliau miežių, žmogaus, drozofilos ir t. t.

Antra, yra objektų, kuriuose konkretūs genetiniai reiškiniai yra lyg ir paviršiuje, lengviausiai prieinami eksperimentatoriui. Neilga genetikos mokslo istorija šią tiesą puikiai iliustruoja. Iš pradžių vyravo augalų genetiniai tyrimai. Netrukus juos išstūmė vaisinė muselė *Drosophila melanogaster*, dar prieš Antrąjį pasaulinį karą šalia drozofilos atsirado grybas *Neurospora crassa*. Po Antrojo pasaulinio karo vis labiau genetikoje įsigalėjo bakterijos ir virusai, po jų aukštesnė pakopa buvo žemesnieji eukariotai – vienaląsčiai grybai (ypač mielės), pirmuonys. Šiuo metu vėl pirmauja drozofila, bet šalia jos vis reikšmingesni atradimai daromi su žinduoliais. Ir dėl daugelio priežasčių į lyderio pozicijas veržiasi žmogaus genetika.

Kintamumas yra tokia pat svarbi gyvų organizmų savybė, kaip ir paveldimumas. Pirma, jis lemia organizmų įvairovę ir yra bazė joms evoliucionuoti. Tai puikiai suvokė evoliucijos mokslo kūrėjai Lamarkas (J. B. de Lamarck) ir Darvinas (Ch. Darwin). Antra, ne mažiau svarbus jau gamtoje egzistuojančių rūšių kintamumas jų viduje. Jis yra pirminė populiacijų susidarymo ir polimorfizmo priežastis. Populiacija (lot. *populatio* – gyventojai) – elementariausias mikroevoliucijos vienetas, rūšies prisitaikymo prie geografinės (erdvinės) aplinkos įvairovės būdas. Polimorfizmas (gr. *polymorphos* – daugialypis, įvai-

rus) yra vidurūšinė įvairovė. Matyt, didžiausias yra žmogaus polimorfizmas. Vidurūšinė įvairovė teikia rūšiai didesnių galimybių išgyventi kintančioje aplinkoje. Populiacijų ir polimorfizmo atsiradimas ir ypač išlikimas, dinamika yra specifiniai genetiniai reiškiniai. Juos tiria specialios genetikos šakos – evoliucinė genetika ir populiacijų genetika.

Paveldimasis (arba genotipinis) kintamumas. Tik jis teikia medžiagos evoliucijai ir vidurūšinei įvairovei. Tai kombinacinis kintamumas (rekombinacijos) ir mutacijos.

> **Kombinacinis kintamumas** – nauji genų, chromosomų ir kitų struktūrų arba jų dalių deriniai, atsirandantys, kai įvairiais būdais organizmai keičiasi genetinėmis struktūromis arba jų dalimis.

Kombinacinis kintamumas, kaip ir požymių paveldėjimas, yra specifinis įvairioms organizmų grupėms. Genetinė rekombinacija priklauso nuo genetinių struktūrų ir dauginimosi – lytinio proceso ypatumų.

Sunkiau nusakyti, kas yra mutacijos (lot. *mutatio* – kitimas) dėl jų įvairovės ir įvairiausio apibūdinimo (žr. de Fryzo mutacinę teoriją, VI sk.). Pagal svarbiausią ypatybę –

> **mutacijos** yra nauji genetinių struktūrų pokyčiai.

Vienas iš genetikos uždavinių yra išsiaiškinti, kaip atsiranda rekombinacijos ir mutacijos, kaip šiuos reiškinius valdo organizmai ir kaip tai galime padaryti mes, žmonės, praktiniais tikslais, kokios paveldimų kitimų ypatybės, tipai, kaip paveldimos mutacijos.

Nepaveldimas kintamumas atrodytų nelabai reikšmingas, nevertas kiek didesnio genetikų dėmesio. Tačiau taip nėra. Nepaveldimi kitimai – modifikacijos (lot. *modificatio* – keitimas) yra būdas, kuriuo pasireiškia dar viena bendra visų organizmų ypatybė, skirianti gyva nuo negyva. **Gyvi organizmai geba prisitaikyti prie aplinkos veiksnių**, tiek prie naudingų, tiek prie žalingų. Šis prisitaikymas, adaptacija, priklauso nuo genetinių struktūrų, genų veiklos pokyčių, arba specialių genų, kurių paskirtis – lemti prisitaikymą prie konkrečių aplinkos veiksnių. Genetika aiškina adaptacijos ir modifikacijų priežastis. Tai **ekologinės genetikos** uždavinys, kuri tiria genetinių struktūrų nulemiamą organizmo santykį su aplinka.

Dėl vystymosi pokyčių, kuriuos sukelia vidiniai ir išoriniai veiks

niai, gali atsirasti raidos sutrikimų – morfozių (gr. *morphosis* – atvaizdas), teratologinių reiškinių (gr. *teratos* – pabaisa, apsigimėlis).

Teratologiniai reiškiniai – tai **įvairios prigimties pokyčiai**. Gali būti paveldimi pokyčiai – mutacijos, bet dažniausiai būna nepaveldimi pokyčiai – morfozės. Vienas iš genetikos uždavinių yra atskirti paveldimus organizmų pokyčius nuo nepaveldimų.

Nustatyti morfozes sukeliančius veiksnius **teratogenus** yra net svarbiau negu išaiškinti **mutagenus** (mutacija + gr. *genesis* – kilmė) – veiksnius, kurie sukelia mutacijas. Mutacijos yra retos, o morfozės gali būti beveik šimtaprocentinės. Antai nėščios moterys, vartojusios skausmą malšinantį vaistą talidomidą, vitamino – folio rūgšties analogą, gimdė vaikus neišsivysčiusiomis galūnėmis. Vaikai skyrėsi tik pažaidos dydžiu.

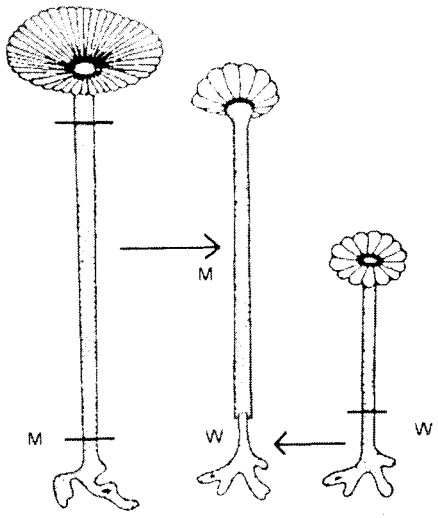
Genai ontogenezėje. Epigenetinis paveldimumas. Atskirą grupę reiškinių sudaro genetinių struktūrų, genų, jų veiklos pokyčiai individualioje organizmo raidoje, **ontogenezėje** (gr. *on/ontos* – esąs + genezė). Gerai žinoma, kad daugialąsčiai, sudėtingos sandaros organizmai (žmogus, gyvūnai, augalai) vystosi iš vienos apvaisintos kiaušialąstės – **zigotos** (gr. *zygote* – sujungta į porą). Ląstelės ne tik dalijasi, bet ir specializuojasi, diferencijuojasi. Atsiranda jų sandaros ir veiklos skirtumų. Formuojasi audiniai, organai.

Diferencijuotų ląstelių skirtumai gali būti labai stabilūs. Tai gerai iliustruoja vėžinių ląstelių tyrimai. Vėžinės ląstelės gali be perstojo dalytis, o tai normaliai nebūdinga **somatinėms** (gr. *soma* – kūnas) ląstelėms. Tačiau vėžinių ląstelių kultūros stabiliai (net iki 10 ir daugiau metų kultivavimo) skiriasi priklausomai nuo audinio organo, iš kurio auglio ląstelių pradėtos auginti.

Skiriama ypatinga paveldimumo forma – **laikinasis,** arba **epigenetinis** (gr. *epi* – po + *genesis* – kilmė), **paveldimumas**. Taip šis paveldimumas vadinamas todėl, kad 1) jis atsiradęs dėl antrinių, vėliau, po DNR sintezės, vykusių procesų ir 2) jį sudaro citoplazminės, antrinės struktūros, kurios autonomiškos, nors ir kilusios iš ląstelės branduolio genų. Deja, kaip atsiranda šis laikinasis tik diferencijuotų ląstelių paveldimumas, ištirta tik iš dalies, ir tai yra viena iš šiuolaikinės genetikos problemų.

Genetines somatinių ląstelių ypatybes tiria **somatinių ląstelių genetika.**

Genetinius ontogenezės pamatus ir stambių morfologinių požymių, tokių kaip bendra organizmo sandara, organų išsivystymas,



1.1 pav. **Branduolių transplantacija dumblio *Acetabularia* rūšių ląstelėse:**
M – *A. mediterranea*, W – *A. wettsteinii*

paveldėjimas, tiria dvi glaudžiai susijusios genetikos šakos **ontogenetika** ir **morfogenetika.** Suprantama, kad šios dvi šakos yra labai specifinės, nes tiria konkrečias organizmų grupes, bet nėra tik daugialąsčių, sudėtingos sandaros, organizmų monopolis. Paprastesnė gali būti ir vienaląsčių organizmų raida. Antai iš bacilų ląstelių išsivysto sporos. Iš vienaląsčių grybų vegetatyvinių ląstelių vystosi lytinės ląstelės. Dar sudėtingesni pokyčiai vyksta kai kurių vienaląsčių dumblių, pvz., *Acetabularia*. Paprasta ląstelė diferencijuojasi į struktūrą, imituojančią kepurėtuosius grybus. Susidaro „kepurėlė“, išsivysto rizoidas (1.1 pav.). Labai domimasi gleivūnu *Dictyostelium discoideum*. Jis blogomis sąlygomis iš vienaląsčių sudaro daugialąstes diferencijuotų ir specializuotų ląstelių struktūras ir yra puikus perėjimo iš vienaląsčių į daugialąsčius organizmus pavyzdys. Šio reiškinio genetika jau gana smulkiai ištirta.

Net neląstelinėms gyvybės formoms virusams būdinga ontogenezė. Susidaro baltyminis apvalkalas kapsidas ir specifinės struktūros, kuriomis virusas tvirtinasi prie šeimininko ląstelės ir prasiskverbia į jos vidų.

Ontogenetika ir morfogenetika šiuo metu yra intensyviausiai plėtojamos genetikos šakos. Plėtotės tempais su jomis gali varžytis **onkogenetika** ir su ja susijusi ląstelės ciklo (dalijimosi) genetika. Onkogenetika tiria genetinius vėžio pamatus, bet „piktybinio“, tiksliau, nereglamentuoto, somatinių ląstelių dalijimosi priežastį galima suvokti tik ištyrus tai, kaip genetiškai valdomas normalus ląstelės dalijimasis.

Elgsenos genetika. Signalinis paveldimumas. Gyvūnų elgsena, aukštoji nervinė veikla, t. y. žmogaus mąstymas, – sudėtingiausi požymiai. Dėl šios priežasties elgsenos genetika kol kas yra reiškinių lygio, todėl šioje knygoje atskirai nenagrinėjama. Šiuo metu tik nustatoma, kiek kuri nors konkreti elgsenos ypatybė (pvz., paukščių

migracija, jų vestuviniai šokiai ir kt.) priklauso nuo genų, o kiek nuo aplinkos ir išmokimo. Mat nemažai informacijos gyvūnai gauna iš aplinkos per sąlyginius refleksus. Ir tai ne bet kokia informacija, o toji, kuri sudaro specifines gyvūno elgsenos ypatybes ir kuria mes apibūdiname patį gyvūną. Vadinasi, šią elgsenos ypatybę vertiname kaip sistematikos požymį.

Informacija, perduodama iš kartos į kartą per mokymąsi, sąlyginius refleksus, vadinama **signaliniu paveldimumu.**

Ypatingą reikšmę signalinis paveldimumas turi žmogui. Per sąlyginius refleksus, išmokimą žmogus gauna labai daug informacijos. Be jos jis nebūtų **ŽMOGUS.**

Gyvūnų jaunikliams šis laikotarpis taip pat yra svarbus. Jie irgi imlesni signalinei informacijai. Ančiukai, išperinti inkubatoriuje, „nesusikalba“ su antimis. O reikalingi signaliniai ryšiai gali atsirasti tarp ančiukų ir juos perėjusios vištos arba lapiukai gali sekioti paskui lazdą, kurią velka žeme žmogus.

Žinoma, ir tuo atveju, kai elgsenos ypatybę lemia signalinis paveldimumas, dalyvauja genai. Pagrindinis žmogaus signalinės informacijos būdas – kalba, susijusi su tam tikra kalbos padargų sandara. O tai jau lemia genai. Sąlyginiai refleksai taip pat priklauso nuo genų. Kaip ir kalbos padargai, evoliucionavo smegenys, jų sandara ir veikla, vystėsi aukštoji nervinė veikla. Visa tai fiksuota genuose, yra paveldima. Kuo toliau pažengusi aukštoji nervinė veikla, tuo didesnė yra signalinės informacijos dalis ir jos reikšmė gyvūno elgsenai. Tos elgsenos ypatybės, kurios pasireiškia kaip **nesąlyginiai refleksai**, yra įgimtos, tiesiogiai paveldimos. Jas lemiančių genų, kaip ir kitų, veikla įvairiai priklauso nuo aplinkos ir taip pat yra genetinių tyrimų objektas.

1.2. Trumpa genetikos istorijos apžvalga

Dar visai netolimoje praeityje genetikos kursą buvo galima dėstyti istoriniu principu. Genetika ryškiai vystėsi nuo paprasčiausių iki sudėtingiausių genetinių reiškinių, jų mechanizmų, nuo taisyklių – dėsnių nustatymo iki jų išimčių analizės. Tačiau dabar tai padaryti neįmanoma dėl didelio genetikos šakų ir problemų skaičiaus. Genetikos istorija,

kad ir glaustai išdėstyta, padeda geriau suvokti bendrųjų genetinių reiškinių esmę, pagrindinius spręstų problemų momentus.

Žemiau išdėstyta genetikos istorija yra iš tikrųjų trumpa ta prasme, kad nagrinėjami tik pagrindiniai genetikos raidos momentai. Bet tai nėra tradicinė kalendorinė datų, pavardžių, įvykių istorija. Naudojantis istorinio dėstymo metodo privalumais, bendrosios genetikos problemos pateikiamos laike. Taip lengviau išskirti, kas yra visiems organizmams esmingiausia, bendra.

1.2.1. Pirmosios paveldimumo ir kintamumo hipotezės

Citologija ir embriologija – genetikos pamatas. Kad organizmai pasižymi paveldimumo savybe, žmonės pastebėjo seniai, augindami gyvulius ir augalus, stebėdami gyvąją gamtą. Tačiau norint paaiškinti, kaip vyksta požymių paveldėjimas, kintamumas, reikalingos esminės žinios apie ląstelę. Tuo tarpu pati ląstelė Huko (R. Hooke) atrasta tik 1665 m. Vis dėlto buvo suvokta, kad palikuonys nevykstant dviejų skirtingų lyčių kontaktui neatsiranda. Aristotelis manė, kad vyriška lytis suteikia „gyvybinę jėgą" medžiagai, esančiai moteriškame organizme.

Didėjo techninės mokslo galimybės, buvo išrastas mikroskopas, atrastos ląstelės. Pagaliau pavyko atrasti lytines ląsteles ir išaiškinti lytinį procesą, suvokti jo esmę. Pirmiausia 1667 m. Levenhukas (A. Leewenhoek) atrado **spermatozoidus**. XVII–XVIII a. kilo kova tarp **preformizmo** ir **epigenezės** teorijų šalininkų. Tai iš tikrųjų buvo pirmas bandymas paaiškinti, kaip lytinėse ląstelėse „surašyti" būsimojo individo požymiai. Preformistai tvirtino, kad lytinėse ląstelėse, konkrečiai spermatozoiduose, galima įžiūrėti mažą žmogeliuką humunkulą. Kiek falsifikuojamuose spermatozoido piešiniuose įžiūrimos atskiros žmogaus kūno dalys. O epigenezės šalininkai teigė, kad visi organizmo požymiai, nors ir užprogramuoti lytinėse ląstelėse, vystosi iš naujo, bet kaip, nepajėgė paaiškinti.

Nuožmi ilgametė preformistų ir epigenezės šalininkų kova įtvirtino labai svarbią mintį:

lytinėse ląstelėse yra būsimo organizmo pradai, planas.

Tik klausimas, kokiu būdu jose „surašyti" būsimo individo požymiai.

Kintamumas + paveldimumas = evoliucija. Kur kas daugiau negu citologijos atradimai domėtis paveldimumu ir kintamumu XIX a. skatino evoliucijos idėjos:

> evoliucija be paveldimo kintamumo neįmanoma, kintamumas ir paveldimumas yra tarp pagrindinių evoliucijos veiksnių.

Kova tarp evoliucijos šalininkų ir tų mokslininkų, kurie manė, kad gyvieji organizmai nesikeičia, buvo nuožmesnė negu tarp preformistų ir epigenezės šalininkų.

Lamarkas (J. B. P.-A. de Lamarck) buvo vienas pirmųjų, tvirtinusių, kad gyvieji organizmai kinta ir dėl to gali atsirasti naujos rūšys. Jo mintys apie kintamumą apibendrintos knygoje „Zoologijos filosofija" (1809). Deja, būdamas pirmasis kintamumo tyrinėtojas, Lamarkas suplakė į vieną krūvą paveldimus ir nepaveldimus pokyčius. Su jo vardu siejama **„įgytų požymių" problema**, t. y. kad organizmo raidoje įgyti požymiai yra paveldimi. Laikantis šios nuostatos, galima teigti, kad jei žmogus treniruojasi, tai galingesnius jo raumenis turėtų paveldėti jo palikuonys, kaip ir atsparumą šalčiui, įgytą grūdinantis. Maža to, Lamarkas manė, kad evoliuciją, taigi ir kintamumą lemia organizmo noras, poreikis tobulėti. Tada galima daryti išvadą, kad juo protingesnis gyvūnas, tuo geriau yra įvaldęs savo evoliuciją (žr. M. Yčas „Apie biologiją", 1994, 34 sk.).

Tiek „įgytų požymių" paveldėjimas, tiek vidinio poreikio skatinama evoliucija sukėlė diskusijų audrą, kuri tęsiasi iki šiol.

Darvino pangenezės hipotezė. Idėja apie paveldimumo vienetus. Dar didesnę audrą negu Lamarko „Zoologijos filosofija" sukėlė Darvino 1859 m. paskelbta knyga „Rūšių kilmė". Joje nurodomi trys evoliucijos veiksniai: kintamumas, pokyčių paveldėjimas ir atranka. Bet suprantamas klausimas, kurį iš karto teko išklausyti Darvinui ir jo pasekėjams: o kaip atsiranda organizmų pokyčiai ir kaip jie paveldimi? Nori nenori į šį klausimą teko atsakyti. 1868 m., praėjus 9 metams nuo „Rūšių atsiradimo" paskelbimo, Darvinas išleido knygą „Naminių gyvulių ir kultūrinių augalų kitimas", kurioje išdėstė „laikiną pangenezės hipotezę". Anot Darvino, yra specialūs paveldimumo vienetai – gemulos, kurios lemia atskirų organizmo organų raidą. Jos gaminasi įvairiuose organuose ir iš jų patenka į lytines ląsteles. Čia susitelkia visas gemulų rinkinys. Jeigu organas pakinta, tai pakinta ir gemula. Tokie pokyčiai persiduoda palikuonims. Štai ir vėl Lamarkas!

2. 1313

BIBLIOTEKA

Darvino pangenezės hipotezė prieštaravo tuo metu žinomiems faktams (gemulų „keliavimas“ į lytines ląsteles) ir buvo labai naivi. Tai pripažino net jo šalininkai. Bet Darvinas buvo įžymybė, ir bet koks jo „nusičiaudėjimas“ buvo visiems žinomas. Todėl nepraslydo nepastebėta ir pangenezės hipotezė. Ne taip, kaip niekam nežinomo užkampio vienuolio Mendelio darbas.

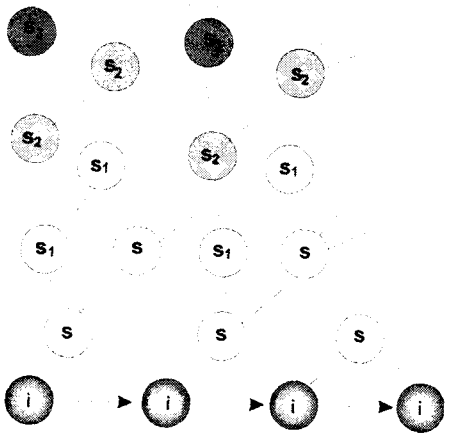
Darvino idėja apie paveldimumo vienetus susidomėjo kiti mokslininkai. Antrojoje XIX a. pusėje prasidėjo tikra paveldimumo hipotezių kūrimo karštligė. Tobulesnėse iš šių hipotezių buvo atmesta Darvino mintis, kad paveldimumo vienetai keliauja į lytines ląsteles, kad ontogenezėje įgyti pokyčiai yra paveldimi. Remiantis aukščiau minėtais citologijos tyrimais, buvo manoma, kad **paveldimumas susijęs su branduoliu ir chromosomomis.**

Pasak de Fryzo (H. de Vries) 1889 m. paskelbtos pangenezės hipotezės, paveldimumo vienetai pangenai yra ląstelėje ir persiduoda iš ląstelės į ląstelę joms dalijantis. Taigi visos ląstelės genetiniu atžvilgiu yra lygiavertės. Pangenai yra branduolyje, nes šį turi kiekviena ląstelė. Ar tai ne šiuolaikinė paveldimumo teorija?!

Veismano (A. Weismann) **paveldimumo ir ontogenezės hipotezė** XIX a. pabaigoje (1882 m.) buvo labai populiari, sukėlė dideles diskusijas. Kai kurios jos idėjos atsispindėjo tolesnėje genetikos raidoje, o kai kurios joje keliamos problemos dar neišspręstos ir šiandien. Paveldimumo vienetų idėja irgi perimta iš Darvino.

Viena iš teigiamų Veismano hipotezės savybių yra ta, kad jis ypatingą reikšmę teikė chromosomoms teigdamas, jog jose yra paveldimumo vienetai; atmetė Lamarko požiūrį į kintamumą, kad įgytieji ontogenezėje požymiai yra paveldimi; pirmasis bandė paaiškinti, kaip vyksta ląstelių specializacija, diferenciacija. Dalijantis motininei ląstelei (pvz., zigotai), abi dukterinės ląstelės turėtų būti tokios pat, kaip ir motininė ląstelė, tačiau iš tikrųjų jos gali aiškiai skirtis viena nuo kitos ir nuo motininės ląstelės. Kaip atsiranda šie skirtumai, dėl kurių ląstelės specializuojasi, diferencijuojasi į audinius ir organus? Veismanas teisingai suformulavo šią pagrindinę ontogenezės problemą, ir tai buvo geras kelrodis visiems kitiems tyrinėtojams, bandžiusiems vėliau spręsti šį klausimą.

Pasak Veismano, reikia skirti idioplazmą (gr. *idea* – sąvoka, vaizdinys), t. y. generatyvines ląsteles, ir somą (gr. kūnas). Soma yra tik apvalkalas idioplazmai apsaugoti. Jis susidėvi ir miršta, o idioplazma pereina iš vienos somos į kitą – keičia apvalkalą ir yra amžina. Ir dabar šios



1.2 pav. **A. Veismano pasiūlyta individualios raidos schema:**
i – generatyvinės ląstelės; *s*, s_1, s_2, s_3 – somatinių ląstelių specializavimasis, prarandant genetinius vienetus

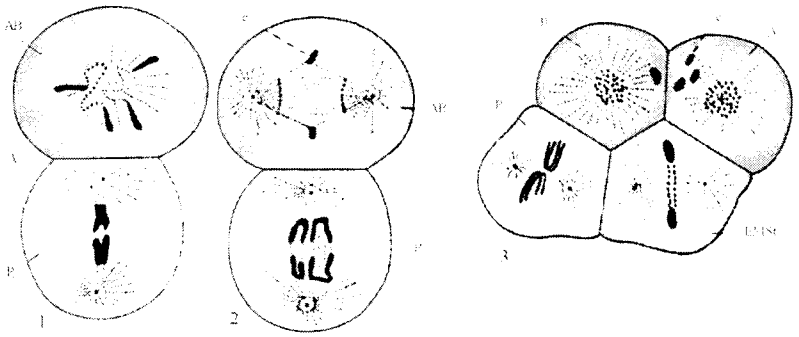
idėjos, dažniausiai neminint Veismano, pateikiamos kaip ultramodernios. Nesigilinant galima pasakyti, kad lytinės ląstelės yra savitos kūno ląstelės. Jos atlieka dauginimosi ir rekombinacijos funkcijas ir, kaip bet kuri savitų ląstelių grupė, yra evoliucijos rezultatas. Kaip tik lytinės ląstelės yra istoriškai vienos seniausių savitųjų ląstelių, nes jas turi jau vienaląsčiai eukariotai: grybai, pirmuonys. Bet šių organizmų lytinės ląstelės diferencijuojasi iš vegetatyvinių, t. y. iš somatinių, ląstelių.

Veismanas manė, kad kiekvienoje ląstelėje yra didelis paveldimumo vienetų rinkinių skaičius. Dalijantis zigotai, viena ląstelė paveldi bent po vieną kiekvienos rūšies paveldimumo vienetą, kita dėl netolygaus pasiskirstymo dalį paveldimumo vienetų būna praradusi (1.2 pav.). Ši ląstelė ir yra somatinė. Jai dalijantis, gali būti toliau prarandami paveldimumo vienetai, o somatinės ląstelės gali vis labiau specializuotis. Taigi somatinės ir generatyvinės ląstelės genetiniu atžvilgiu, anot Veismano, turėtų būti nelygiavertės: somatinės ląstelės turėtų būti praradusios dalį paveldimumo vienetų, o generatyvinių išlikęs visas jų rinkinys. Tad, pasak Veismano, yra

generatyvinis kelias: visos generatyvinės ląstelės kyla tik iš generatyvinių ląstelių.

Veismano hipotezės kraštutinumai sukėlė daug ginčų, tačiau kartu išpopuliarino ne tik Veismaną, bet ir paveldimumo vienetų idėją. Ypač ginčytasi dėl dviejų teiginių: 1) kategoriškas organizmų skirstymas į somą ir idioplazmą; 2) genetinis somatinių ląstelių nevisavertiškumas. Pirmasis teiginys yra daugiau filosofinis. Kas pirma? Kiaušinis ar višta? O antrasis skatino eksperimentuoti.

Pirmieji sukruto botanikai. Jie Veismano teiginį, kad somatinės ląstelės genetiškai nevisavertės, nuneigė labai paprastai. Pasinaudojo



1.3 pav. **Askaridės (*Ascaris megalocephala*) chromosomų segmentacija ir dalinė diminucija somatinėse ląstelėse:**
P_1, P_2 – generatyvinės ląstelės; AB, A, B, EMSt – somatinės ląstelės: *1, 2* – generatyvinėse ląstelėse yra dvi poros stambių chromosomų; *3* – A ir B somatinėse ląstelėse yra daug smulkių chromosomų; dalis chromosomos (galai) yra prarandama (vyksta diminucija) – pažymėta e. Ryškiausiai diminucija ir fragmentacija pavaizduota *3* – EMSt ląstelėje

seniai žinomu faktu: iš labai savito augalo organo, pvz., iš begonijos lapo, galima regeneruoti augalą su požymiais, būdingais motininiam augalui, iš kurio paimtas lapas. Šiuo metu pavyksta regeneruoti augalą iš pavienės somatinės ląstelės. Gaunama tiksli motininio augalo kopija. Iš somatinių varlės ląstelių regeneruojama varlė su visais donorinei varlei būdingais požymiais. Taigi lyg ir galima būtų tvirtinti, kad visos organizmo ląstelės genetiniu atžvilgiu yra lygiavertės, arba **totipotencinės** (lot. *totalis* – visiškas, pilnutinis). Tačiau ši problema labai sudėtinga ir šiuolaikinėje genetikoje įvairiai sprendžiama.

Stabilūs genetinės medžiagos pokyčiai ontogenezėje. Tam tikrais atvejais individualioje raidoje gali atsirasti stabilūs genetinių struktūrų pokyčiai. Veismanas individualaus vystymosi hipotezę grindė kai kuriais faktais iš bestuburių biologijos. Yra gyvūnų, kurių somatinės ląstelės aiškiai skiriasi nuo generatyvinių ląstelių net chromosomomis. Pavyzdžiui, askaridžių (*Ascaris megalocephala*) generatyvinėse ląstelėse yra dvi stambios chromosomos. Somatinėse ląstelėse jos subyra į daugelį smulkių chromosomų. Dalis genetinės medžiagos patenka į citoplazmą ir yra prarandama (1.3 pav.). Tai būdinga vabalams *Dytiscus*, musėms *Miastor* ir kt.

Ontogenezėje stabilūs pokyčiai ląstelės branduolyje nustatyti ir branduolių transplantacijos metodu (žr. p. 176), bet kol kas šių stabilių

branduolio pokyčių pobūdis nepakankamai išaiškintas. Be to, pakako patobulinti branduolių persodinimo techniką, ir iš tos pačios rūšies varlių somatinių ląstelių pavyko išauginti normalius buožgalvius net tada, kai branduoliai buvo perkelti iš buožgalvio skrandžio epitelio ląstelių į nediferencijuotas kiaušialąstes. Kaip paaiškės toliau (žr. p. 271), ląstelių specializacijai visiškai nebūtinas genetinės medžiagos kitimas ontogenezėje. Matyt, Veismano aiškinimą apie individualią raidą dabar galima vertinti tik kaip vieną iš diferenciacijos mechanizmų, tačiau realiai egzistuojantį.

> Pastaruoju metu visuotinai pripažinta, kad somatinės gyvūnų ląstelės gali prarasti totipotenciją. Gyvūnams nustatytas ir generatyvinis kelias.

Kitas klausimas, ar šie pokyčiai yra grįžtamieji, ar negrįžtamieji? Komplikuojasi ir augalų somatinių ląstelių totipotencijos klausimas (žr. p. 179).

Veismanas ir „įgytų požymių" problema. Neabejotina Veismano įtaka ir kintamumo tyrimams. Kaip minėta, jis kategoriškai pasipriešino „įgytų požymių" paveldėjimui. Norėdamas jį nuneigti, Veismanas 22-joms pelių kartoms kapojo uodegas. Nuo to pelės netapo trumpauodegės. Šis bandymas, nors labai populiarus ir mėgstamas cituoti, yra naivus ir nevykęs. Tačiau pati idėja apie tai, kad „įgyti požymiai" nepaveldimi, buvo teisinga, kėlė ginčus ir skatino eksperimentuoti, ieškoti tikrų paveldimo kintamumo priežasčių. Kartu susiformavo bendra taisyklė, kad

> organizmo raidoje įgyti požymiai yra nepaveldimi,

bet, kaip ir kiekviena taisyklė, ji turi išimčių, kurios bus specialiai nagrinėjamos (žr. p. 247).

Vis dėlto Veismanas klydo manydamas, jog idioplazmai (paveldimumo vienetams) aplinka visiškai nedaro poveikio.

Aplinkos veiksniai:
- keičia genų veiklą;
- sukelia paveldimus pokyčius – mutacijas;
- keičia genetinės rekombinacijos procesus;
- gali sukelti stabilią genetinių struktūrų pertvarką somatinėse ląstelėse.

1.2.2. Genetika – XX a. mokslas

Eksperimentinės genetikos pradžia. XX a. pradžioje jau buvo visos prielaidos (suvokti dauginimosi procesai, turėta pakankamai žinių apie ląstelę ir jos dalijimąsi, buvo tobulesni hibridizacijos metodai) eksperimentiškai spręsti, kaip paveldimi požymiai.

Genetikos gimimo data teisėtai laikoma 1900 m., kai trys mokslininkai – de Fryzas (H. de Vries) Olandijoje, Korensas (C. Correns) Vokietijoje ir Čermakas (E. Tschermak) Austrijoje nepriklausomai vienas nuo kito nustatė pirmuosius požymių paveldėjimo dėsnius ir pasiūlė eksperimentinį metodą paveldimumui tirti. Tačiau šių mokslininkų laukė nemažas nusivylimas. Jie surado prieš 35 metus (1865) paskelbtą Mendelio (G. Mendel) darbą, kuris visais atžvilgiais, ypač išvadomis gerokai pranoko jų darbus. Mendelio darbas neatsitiktinai išgulėjo 35 metus nežinomas. Jis gerokai aplenkė savo epochą, ir mokslininkai, kurie buvo susipažinę su Mendelio darbu, jo nesuprato. Greičiau galima stebėtis, kad Mendelio darbas ne tik nedingo be pėdsako, o dar nustūmė į antrą vietą tuos, kurie iš tikrųjų mokslui atrado pirmuosius paveldėjimo dėsnius ir tyrimo metodą.

Mendelis padarė **5 stambius atradimus:**

1. Sukūrė pirmą eksperimentinį metodą požymių paveldėjimui tirti tų organizmų, kuriems būdingas tipiškas lytinis procesas, t. y. **hibridologinį metodą.**

2. Sukūrė aukštesniųjų eukariotų **lytinių ląstelių** genetinės analizės metodą – analizuojančiuosius kryžminimus ir nustatė, kad lytinės ląstelės yra genetiškai grynos. Vėliau šis metodas Morgano (T. H. Morgan) ir jo bendradarbių buvo labai sėkmingai pritaikytas chromosomų genetinei sandarai ir rekombinacijai tirti.

3. Išaiškino **aukštesniųjų eukariotų požymių paveldėjimo dėsnius**:

- pirmosios kartos vienodumo ir dominavimo;
- skilimo – pradedant 2-ąja karta palikuonys susiskaido į grupes tam tikrais santykiais;
- nepriklausomo požymių paveldėjimo.

Visi jie yra idealūs ir elementarūs aukštesniųjų eukariotų požymių paveldėjimo dėsniai ir pasireiškia tik esant tam tikroms sąlygoms. Dėsnių galiojimo ribos ir išimtys yra vienodai svarbios ir bus atskirai nagrinėjamos.

4. Nustatė **kombinacinio kintamumo tipą, būdingą tik eukariotams.** Jo esmė paaiškėjo vėliau, pakartotinai atradus Mendelio dėsnius. Mejozėje susidaro nauji chromosomų ir kartu jose esančių paveldimumo vienetų genų deriniai.

5. Įrodė, kad **tikrai yra paveldimumo vienetai.** Ši išvada buvo padaryta iš lytinių ląstelių genetinės analizės ir nepriklausomo požymio paveldėjimo dėsnio. Mintį, kad lytinėse ląstelėse ir zigotoje yra būsimojo organizmo planas, „užrašyti" būsimo individo požymiai, subrandino dar preformistai ir epigenezės šalininkai. Tik buvo neaišku, kaip tai padaryta. Mendelis eksperimentiškai įrodė, kad realiai yra paveldimumo vienetai. Tai logiška išvada iš nepriklausomo požymių paveldėjimo dėsnio:

> jeigu lytinėse ląstelėse yra užrašyti būsimojo individo požymiai ir kiekvienas požymis paveldimas nepriklausomai, tai lytinėse ląstelėse ir zigotoje kiekvienam požymiui yra atskiras savarankiškas pradas, „užrašas" – veiksnys, genas.

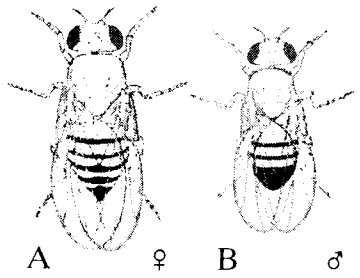
Nei Darvinas, nei kiti paveldimumo hipotezių autoriai jam jokios įtakos neturėjo. Hipotezės buvo pasiūlytos vėliau, ne 1865 m. Terminą *genas* pasiūlė ne Mendelis. Jis nebuvo terminų kūrėjas. Tai irgi Dievo dovana. Daugiausia genetikoje jų prikūrė Beitsonas ir Johansenas (W. L. Johannsen). Pirmasis, kaip minėta, 1906 m. „pakrikštijo" genetiką, o antrasis 1909 m. paveldimumo vienetus pavadino genais.

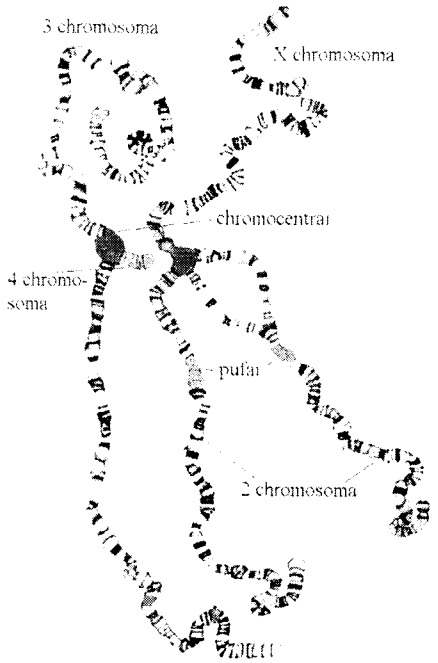
Vėliau buvo nustatyta, kad nors organizmai labai skiriasi genetinėmis struktūromis, jų paveldėjimo būdais, dauginimosi sistemomis, bet

> genai yra visų organizmų visose genetinėse struktūrose – tiek branduolio, tiek nebranduolinėse.

Chromosominė paveldimumo teorija. Morganas ir drozofilos „era" genetikoje. Prabėgo vos dveji metai nuo pakartotinio Mendelio dėsnių atradimo, o 1902 m. Setonas (W. Sutton) ir Boveri (T. Boveri) suvokė Mendelio dėsnių esmę. Juos lemia chromosomų pasiskirstymas tarp dukterinių ląstelių mejozėje. Tai buvo Setono diplominis darbas!

Tačiau nuosekli chromosominė paveldimumo teorija (žr. p. 256) Morgano ir jo bendradarbių Bridžeso (C. B. Bridges), Startevanto





1.4 pav. **Drozofila**:
viršuje: *A* – patelė, *B* – patinėlis; apačioje –politeninės (gigantinės) drozofilos seilių liaukų ląstelių chromosomos. Konjugavusios ir mitozėje, išskyrus nedidelę 2-osios chromosomos dešiniojo peties segmentą šalia chromocentro. Paryškinti nedideli pufai ir chromocentrai, kuriais chromosomos sujungtos

(A. M. Sturtevant), Miolerio (H. J. Muller) buvo sukurta vėliau, 1911–1919 m. Jos esmė:

- **genas** yra chromosomos dalis;
- toje pačioje homologinių chromosomų vietoje (lokuse) yra tapatūs arba giminiški (**aleliniai**) genai – to paties geno struktūrinės atmainos;
- chromosomoje genų yra daug ir visi išsidėstę **linijiškai**, vienas paskui kitą; vienoje chromosomoje esantys genai paveldimi kartu, **sukibę**; jie sudaro tą pačią **sankibos grupę**;
- kiek haploidiniame rinkinyje yra chromosomų, tiek yra ir sankibos grupių.

Amžininkai sakė: Morganui pasisekė, kad jis „pasikinkė" drozofilą. Ši vaisinė muselė (*Drosophila melanogaster*) labai sparčiai dauginasi, subręsta per 10–14 dienų nuo kiaušinėlių padėjimo. Tai neišpasakytas privalumas, palyginti net su vienmečiais augalais, kurių tyrimų rezultatų reikia laukti 2–3 metus. O ką kalbėti apie organizmus, kurie bręsta keletą metų ar net dešimtmečių!

Drozofila turi daug kitų privalumų. Galima auginti termostate griežtai valdomomis sąlygomis. Patinėliai ryškiai skiriasi nuo patelių (1.4 pav.). Apskritai chromosomų nedaug – tik 8, o seilių liaukų ląstelėse jos ypač stambios, patogios smulkiau tirti – tai **gigantinės, arba politeninės, chromosomos**. Drozofilos „era" genetikoje nesibaigė, atrandami vis nauji jos privalumai. Labai daug reiškia ir itin aukštas drozofilos genetikos lygis.

Tirdami drozofilą Morganas ir jo bendradarbiai atrado ir genetinės rekombinacijos tipą, kurį jie pavadino **krosingoveriu** (angl. *crossing* – susikryžiavimas, susikirtimas + *over* – per). Keičiamasi segmentais tarp homologinių chromosomų. Šie tyrinėtojai pasiūlė **metodą** genų vietai ir sekai chromosomose nustatyti. Pirmiausia ji buvo nustatyta drozofilos chromosomų (žr. chromosomų genolapiai, p. 255).

Vėliau chromosominę paveldimumo teoriją papildė sąvoka *genomas*.

Genomas – genų visuma haploidiniame chromosomų rinkinyje, platesne prasme – branduolio genų visuma.

Bendri dėsniai, sąvokos, metodai. Kai kurie chromosominės paveldimumo teorijos dėsniai ir sąvokos yra bendri visiems organizmams, o kai kurie iš jų buvo pritaikyti tiriant kitokią genetinę sandarą turinčius organizmus. Bakterijų DNR molekulė, kurioje yra didžioji genų dalis (arba visi), irgi vadinama chromosoma. Dar plačiau taikoma genomo sąvoka visoms savarankiškoms (autonominėms) genetinėms struktūroms: mitochondrijų, plastidžių, plazmidžių DNR ir kt. Net Morgano ir jo bendradarbių metodai labai vykusiai buvo pritaikyti genetinei virusų analizei (žr. p. 49).

Taigi visus organizmus vienija šie reiškiniai ir struktūros: chromosoma, genas kaip jos dalis, linijinė genų seka chromosomoje, genų sankiba, sankibos grupės, genomas, krosingoverio tipo genetinė rekombinacija.

Mutacijų atradimas. Vėl de Fryzas. Paveldimieji pokyčiai, kuriuos dabar vadiname mutacijomis, buvo žinomi seniai ir netgi buvo panaudoti kuriant naujas vaismedžių, dekoratyvinių augalų veisles. Gyvulininkystėje buvo žinomos Ankono avys trumpomis kojomis, nesugebėjusios peršokti žemą tvorą, botanikoje – pakitusios formos ugniažolės ir kt. Šio tipo pokyčius sąžiningai suregistravo Darvinas ir juos pavadino **neapibrėžtu kintamumu**. Tačiau jo evoliucijos teorijoje šie pokyčiai nebuvo laikomi svarbūs.

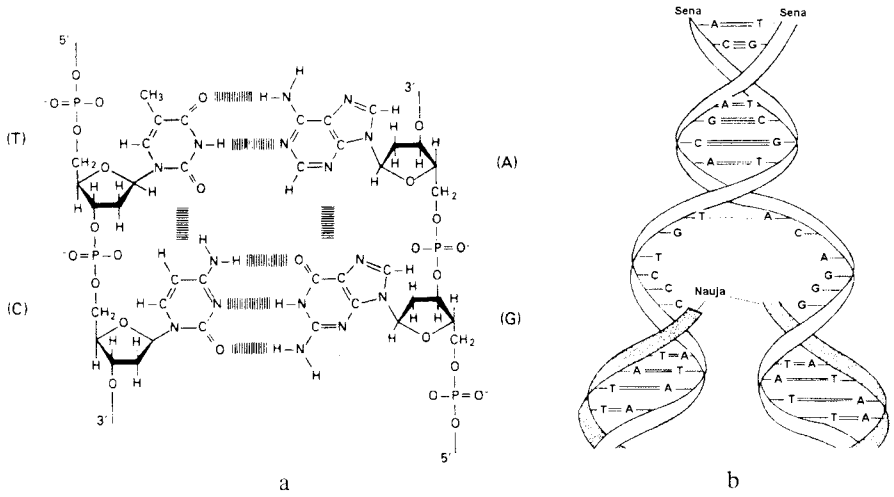
Perversmą sukėlė de Fryzo darbai. Jis ilgus metus tyrinėjo įvairius paveldimus nakvišų (*Oenothera*) pokyčius ir tyrimų duomenis apibendrino dviejų tomų knygoje „Mutacijų teorija“ (1901–1903). Tačiau de Fryzas neteisingai manė, kad mutacijos yra tik stambūs pokyčiai ir rūšys atsiranda iš karto, šuoliškai. Šis teiginys visapusiškai neteisingas, nes pirma, **rūšis yra sistema, visuma organizmų, kurie tam tikru būdu santykiauja su kitais organizmais ir aplinka, užima tam tikrą nišą bendroje ekologinėje sistemoje**. Tokių santykių tik dėl vienos mutacijos atsirasti negali. Jie kuriasi istoriškai, palaipsniui. Antra, dažnesnės yra smulkios mutacijos.

Indukuotosios mutacijos. Mutagenai. Morgano bendradarbis Mioleris 1927 m. Berlyne vykusiame genetikos kongrese perskaitė sensacingą pranešimą apie tai, kad jis sukūrė metodą naujoms drozofilos mutacijoms aptikti, ir įrodė, kad mutacijas sukelia rentgeno spinduliai. Tai buvo pirmasis išaiškintas mutagenas. 1932 m. V. Sacharovas įrodė, jog drozofilos mutacijas sukelia poveikis cheminėmis medžiagomis – jodu, sunkiųjų metalų druskomis. 1936 m. Blekslis (A. F. Blakesle) nustatė, kad poliploidiją sukelia iš rudeninio vėlyvio (*Colchicum autumnale*) išskiriamas alkaloidas kolchicinas. Tačiau galutinai cheminių veiksnių mutageninį veikimą įrodė 1946 m. J. Rapoportas, Auerbach (C. Auerbach) ir Robsonas (J. M. Robson). Kai kurios alkilinančios medžiagos, kurias jie tyrė, yra net stipresni mutagenai už jonizuojančiuosius spindulius.

Naujas šios srities tyrimų etapas ir jų viršūnė – **valdomoji mutagenezė**: tiek **natūralioji** (specialių genų, genetinių struktūrų), tiek **dirbtinė.** Pastaruoju būdu kryptingai pertvarkomi genai: pašalinami, įstatomi nukleotidai arba pakeičiami vieni kitais.

Molekulinės genetikos pradžia. Morganas ir jo bendradarbiai įrodė, kad genas – ne abstrakcija, o materialus vienetas, chromosomos dalis. Tai iš karto sukėlė spėliones, kuri cheminė medžiaga yra genas. O gal genas yra chromosomos, kaip tam tikros struktūros, dalis? Tada suardžius chromosomą išnyktų ir jos genetinė funkcija.

1944 m. atsitiko įvykis, kuris iš pamatų pakeitė ne tik genetikos, bet ir visos biologijos raidą. Eiveris (O. A. Avery), Makliaudas (C. M. MacLeod) ir Makartis (M. McCarthy) įrodė, kad pneumokokų (*Streptococcus pneumone*) transformaciją (žr. p. 542) sukelia DNR. Vieną pneumokokų formą pavyko paversti kita, paveikus pastarosios DNR. Tai pirmasis įrodymas, kad **DNR yra genetinė medžiaga**. Vėliau šią išvadą patvirtino virusų biologijos tyrimai. Į šeimininko ląstelę patenka tik viruso DNR (arba RNR), bet per ją paveldimos visos virusų ypatybės. Be to, įterpus į ląstelę labai atsargiai išskirtą viruso DNR arba RNR, joje susidaro virusai.



a b

1.5 pav. **DNR sandara (*a*) ir sintezė (*b*):**
nukleotidai susijungę poromis G ≡ C ir A = T; nauja DNR grandinė komplementari senajai; tokios pat nukleotidų sekos grandinė prisijungtų prie atitinkamos DNR grandinės ir atliekant molekulinę DNR-DNR hibridizaciją

Kokio atgarsio susilaukė Eiverio, Makliaudo ir Makarčio atradimas, byloja tai, kad jau 1946 m., vos pasibaigus Antrajam pasauliniam karui, įvyko simpoziumas, skirtas tik DNR. Du jo dalyviai Čargafas (E. Chargaff) ir A. Belozerskis įrodė, kad DNR yra polimeras, būdingas įvairiems organizmams.

DNR sandara ir sintezė. Kitas svarbus įvykis – 1953 m. Vatsonas (J. D. Watson) ir Krikas (F. H. C. Crick) paskelbė **DNR sandaros modelį** (1.5 pav.): DNR yra dvigrandė molekulė. Be to, viena grandinė yra komplementari antrajai (kai 1-ojoje yra G, tai 2-ojoje – C, kai 1-ojoje – A, tai 2-ojoje – T), t. y. viena papildo kitą. Viena grandinė su kita sujungtos nepatvariais vandeniliniais ryšiais, todėl viena grandinė gali lengvai atsiskirti nuo kitos. Prie vienagrandžių struktūrų, prisijungus nukleotidams, susidarytų dvi naujos molekulės, tokios pat kaip pradinė. Be to, naujosiose molekulėse viena grandinė būtų sena. Toks sintezės būdas vėliau buvo įrodytas. Jis yra pusiau konservatyvus ir vadinamas **replikacija** (lot. *replicatio* – kartojimas).

Šito genetikai seniai laukė. Mat logiškai mąstant,

genetinė medžiaga turi sintetintis būtent kopijavimosi būdu.

Genetinis kodas. Ką lemia genai? Dar vienas svarbus įvykis. Šį kartą – hipotezė. 1954 m. vėlgi trys mokslininkai Gamovas (G. Gamov), Ričas (A. Rich) ir M. Yčas (pastarasis – Amerikos lietuvis) paskelbė genetinio kodo hipotezę. Pasak jos, DNR molekulėje yra užkoduotos aminorūgščių sekos baltymuose.

Dar gerokai prieš tai Bydlis (G. W. Beadle) ir Teitumas (E. L. Tatum) nustatė, kad genas lemia vieną konkrečią reakciją, katalizuojamą fermento. 1941 m. savo tyrimų rezultatus jie apibendrino žinoma teze: 1 genas – 1 fermentas. Ji šiuo metu yra patikslinta:

1 genas – 1 polipeptidas.

Tad iki Gamovo ieškota ryšio (paprastai cheminio) tarp DNR ir baltymo. Tačiau Gamovo kodavimo idėja buvo iš principo nauja ir biologams bei chemikams neįprasta. 1961 m. Nirenbergas (M. W. Nirenberg) ir Matėjus (A. Mattaei) surado būdą genetiniam kodui išaiškinti, o Krikas ir Breneris (S. Brenner) išsprendė daug principinių genetinio kodo problemų.

1.3.1. Genetika Lietuvoje

Nepriklausomai tarpukario Lietuvai, kaip žemės ūkio kraštui, buvo reikalinga taikomoji genetika – selekcija. Ji pradėta dėstyti Dotnuvos žemės ūkio akademijoje. Tai buvo ir Dionizo Rudzinsko nuopelnas. Daug metų jis dirbo Rusijoje, Maskvoje, buvo Žemės ūkio akademijos profesorius, katedros vedėjas, žymaus rusų genetiko N. Vavilovo mokytojas ir mokslinis vadovas. Pradinės idėjos, kurias puikiai plėtojo N. Vavilovas iš augalų imunogenetikos, genetinių išteklių ir jų netolygaus geografinio pasiskirstymo, buvo Rudzinsko. Mokslines ekspedicijas genetiniams ištekliams kaupti taip pat pirmasis rengė Rudzinskas. Tai nurodo N. Vavilovo veiklos tyrinėtojai (pvz., Резиник С. *Николай Вавилов.* Москва, 1968). Rudzinskas buvo vadinamas Rusijos selekcijos tėvu. Jis pirmasis Rusijoje pradėjo mokslinę selekciją, sukūrė daug javų veislių, 1909 m. įkūrė pirmąją Rusijoje selekcijos stotį.

Lygiai taip pat Rudzinską galima vadinti ir Lietuvos selekcijos tėvu. Grįžęs į Lietuvą, 1922 m. jis įkūrė Dotnuvos selekcijos stotį ir dešimt metų jai vadovavo. Sukūrė 40 žieminių kviečių, avižų, žirnių, linų veislių. Dotnuvos žemės ūkio akademijoje jis skaitė „Augalų genetikos ir selekcijos“ kursą.

Tačiau Lietuvoje naminių gyvulių ir žemės ūkio augalų selekcijos pradžią sunku atsekti. Nors ji buvo ir iki Rudzinsko, bet ją vykdė mėgėjai, labiau prakutę dvarininkai ir dvarų valdytojai. Daržovių, ypač agurkų, selekcijos rezultatais garsėjo Trakų karaimai. Mažiausiai 8 garsios obelų veislės yra Lietuvos vietinės. Garsūs žemaitukai arkliai, Dzūkijos deglosios kiaulės ir kt.

A. Hrebnickis – pirmasis augalų išteklių kaupėjas ir tyrinėtojas. Genetinių išteklių problema Lietuvoje. Pirmasis moksliškai obelų selekcija užsiėmė Adomas Hrebnickis (1857–1941) savo dvare Ignalinos r. (Rojuje). Jis yra pirmasis Lietuvoje genetinių augalų išteklių kaupėjas bei tyrinėtojas. Surado ir pirmasis ištyrė vietines obelų veisles ‘Beržininkų ananasą’, ‘Jono pepiną’, ‘Panemunės baltąjį’ ir kt.

Ir šiuo metu selekcininkai mėgėjai atlieka nuostabius darbus. Vynmedis (A. Paukštė, P. Gailiūnas ir kt.), abrikosai (A. Urbonas), atvaisa (A. Paketūras) Lietuvoje atsirado dėl jų veiklos. Daugybę dekoratyvinių augalų veislių irgi sukūrė selekcininkai mėgėjai (P. Balčikonis, P. Ciplijauskas, J. Tarvydas, S. Eicher-Lorka ir kt.). Tačiau jų veislėms visą laiką gresia praradimo pavojus. Net mokslo įstaigose neišsaugotos ir sunaikintos genetinių išteklių kolekcijos. Todėl viena iš svarbių genetikos problemų Lietuvoje yra kaupti genetinius išteklius, juos tirti ir išsaugoti. Sudarytos ir vykdomos augalų genetinių išteklių programa (A. Būdvytytė), naminių gyvulių genetinių išteklių (J. Šveistys) programos. Bandoma įkurti mikroorganizmų kamienų banką.

Sėkmingiau kaupiami augalų genetiniai ištekliai. Lietuvos sodininkystės institutas turi dideles sodo augalų ir daržovių kolekcijas (A. Tuinyla, A. Lukoševičius, A. Misevičiūtė, M. Baranauskienė). Didelės grūdinių, pašarinių augalų kolekcijos yra Lietuvos žemdirbystės institute. Vilniaus universiteto Botanikos sode sukauptos didelės vaiskrūmių (iniciatorius A. Ryliškis), gėlių (D. Dainauskaitė), dekoratyvinių medžių kolekcijos. Vilniaus universitetas vienas pirmųjų pradėjo kaupti selekcininkų mėgėjų veisles.

Ypač gerai ir apgalvotai tiriami bei saugomi miško augalų genetiniai ištekliai (V. Ramanauskas, J. Danusevičius, R. Gabrilavičius).

Genetika prieškario ir pokario Lietuvos universitetuose. Genetika Kauno Vytauto Didžiojo universitete gerokai vėlavo. Tik 1935 m. Marija Natkevičaitė-Ivanauskienė (1905–1996), prieš tai tyrusi žmogaus kraujo grupių paveldėjimą, 1935–1940 m. kryžmino tūbės (*Verbascum*) genties rūšis ir tokiu būdu tikslino jų sistematiką. Tyrimų rezultatus M. Natkevičaitė apibendrino daktaro disertacijoje „Genetiškai-sistematiški *Verbascum* ir *Celsia* genčių tyrinėjimai" (apginta 1943 m., paskelbta: *Vilniaus universiteto Matematikos-Gamtos fak. darbai*, 1942, t. XIV, sąs. 2, p. 236–345). M. Natkevičaitė dėstė genetikos kursą Kauno, o nuo 1940 m. iki pat 1948 m. – Vilniaus universitete.

Kauno Vytauto Didžiojo universiteto studentai medikai irgi buvo supažindinami su paveldimumo reikšme ligoms per J. Žilinsko, J. Blažio, P. Avižonio paskaitas.

Prieškario vadovėliai ir leidiniai. Didelio atgarsio, bet nevienareikšmiško vertinimo susilaukė populiari P. Šivickio knyga „Gyvoji gamta ir mes". Daug vietos joje skirta paveldimumo problemoms. Mendelio dėsnių pakartotinio atradimo 35-mečiui, 50 m. jo mirties ir 70 m. nuo Mendelio darbo pirmojo paskelbimo sukaktims pažymėti buvo išleistas specialus žurnalo „Kosmos" numeris (1935 m., Nr. 4–6). Šio žurnalo 1936 m. Nr. 4–6 skirtas Dotnuvos selekcijos stoties įkūrėjo Rudzinsko 70-mečiui. Šiame ir kitame populiariame žurnale „Gamta" buvo skelbiama gana daug straipsnių genetikos bei selekcijos klausimais.

Dotnuvos žemės ūkio akademija lenkė universitetą ne tik dėstymu, bet ir vadovėliais. 1928 m. K. Aleksa išleido „Paveldėjimas gyvulininkystėje", o 1936 ir 1939 m. E. Gimbutienė – „Augalų genetika". „Žemės ūkio vadovo" gyvulių veisimo skyriuje (1930 m. 1 leid. – S. Giršovičiaus, o 1936 m. 2 leid. – B. Vitkaus) buvo daug žinių iš genetikos.

Lysenkizmas SSSR ir jo atgarsiai Lietuvoje. Po Antrojo pasaulinio karo ilgą laiką Lietuvoje genetikos nebuvo. Tuo metu Sovietų Sąjungoje vyko aštri kova prieš genetiką. Gana daug genetikų buvo represuota, todėl dirbti genetikos, citologijos srityse tiesiog buvo pavojinga. Šis pavojus ypač sustiprėjo po vadinamosios VASChNIL (Visasąjunginės žemės ūkio mokslų akademijos) 1948 m. rugpjūčio sesijos. Joje lysenkizmas buvo įteisintas kaip oficiali doktrina – „sovietinė genetika".

Jos nesilaikantys buvo laikomi liaudies priešais. Daug genetikų ir juos palaikančiųjų buvo atleisti iš darbo, jiems atiminėjami moksliniai vardai ir laipsniai. Dalis jų atsidūrė tremtyje, kalėjimuose ar buvo fiziškai sunaikinti. Taip atsitiko N. Vavilovui. Kalėjime buvo sušaudytas jaunas, neišpasakytai talentingas genetikas G. Karpečenka, kuris jau buvo suspėjęs pagarsėti pasaulyje darbais iš tolimosios augalų

hibridizacijos srities, sukūręs pirmąją dirbtinę augalų gentį *Raphanobrassica* (žr. p. 407). Cheminės mutagenezės atradėjui J. A. Rapoportui buvo atimti visi vardai, jis buvo atleistas iš darbo (tapo geologu, geologijos mokslų kandidatu).

Pats genetikos mokslas buvo paverstas absurdu. Buvo tvirtinama, kad paveldimumu pasižymi bet kuri kūno, ląstelės dalelė. Pvz., paveldimumas, organizmo požymiai gali persiduoti per metabolitus. Įgyti požymiai esą paveldimi (propaguotas kraštutinis lamarkizmas). Iš bet ko galima išauginti bet ką, tik reikia sudaryti tinkamas sąlygas. Rūšis gali gimdyti kitą rūšį (kviečiai – rugius, o šie – dirses; gegutė – kitus paukščius, ir atvirkščiai). Genų, chromosomų nesą, o jei pastarosios ir esančios, tai tik laikinai, ir t. t. Biologijoje ir su ja susijusiuose taikomuosiuose moksluose klestėjo T. Lysenkos kultas: ką jis pasakė ar padarė, buvo šventa tiesa. Tvirtai buvo kalama, kad yra „sovietinė biologija", „sovietinė genetika". Genetika buvo paversta ideologiniu mokslu. Vyko visiška izoliacija nuo mokslo pasaulio, didėjo biologijos mokslų atsilikimas, kuris ir dabar dar jaučiamas. Kai kuriose biologijos srityse iki šiol tebėra įsigalėjusi nuomonė, esą galima išsiversti be genetikos žinių.

Praslinkus mėnesiui po „garsiosios" VASChNIL'o sesijos, jos analogo susilaukė Lietuva. 1948 m. rugsėjo 20–22 d. vyko Lietuvos mokslų akademijos sesija (*Lietuvos MA žinynas*, 1949, t. IV–V). Aukštųjų mokyklų dėstytojai, mokslininkai dėstė jaunimui apie genus, chromosomas, mitozę ir mejozę, todėl labiausiai kliuvo universitetų, aukštųjų mokyklų tiek prieškario, tiek pokario dėstytojams.

Tačiau Lietuvoje nebuvo skubama naikinti biologijos mokslininkus. Autoritetingiausi biologai J. Dagys, A. Minkevičius, M. Natkevičaitė-Ivanauskienė, P. Šivickis, A. Mačionis labai kategoriškai laikėsi neigiamos pozicijos lysenkizmo atžvilgiu, o P. Snarskis po kritikos „skraiste" sugebėjo dėstyti Mendelio, Morgano, de Fryzo, Johanseno darbų esmę, ir studentai puikiai suprato, kad lamarkizmo kritika tinka ir T. Lysenkai. Vis dėlto ištisus 15 metų lysenkizmas slopino genetikos raidą Lietuvoje.

Dabartinė genetikos būklė Lietuvoje. Eksperimentinė genetika pirmiausia pradėta plėtoti Vilniaus universitete – 1963 m. Tais metais pradėtas dėstyti ir genetikos kursas. 1960–1965 m. jauni įvairių aukštųjų mokyklų absolventai V. Rančelis, J. Rubikas, R. Lekevičius, J. Vasiliauskas, A. Janulaitis, A. Sinkus, A. Basys, D. Čitavičius įstojo į Maskvos ir Leningrado (Sankt Peterburgo) universitetų, institutų aspirantūrą ir sudarė genetikos Lietuvoje pamatą.

Šiuo metu genetiniai tyrimai vykdomi Vilniaus universitete (VU) ir visuose biologinio profilio institutuose, aukštosiose mokyklose. VU Botanikos ir genetikos katedroje (J. Lazutka, R. Lekevičius, V. Rančelis ir kt.) dirbama genotoksikologijos ir mutagenezės srityse. VU Botanikos sode ne tik kaupiami ir tiriami genetiniai augalų ištekliai,

bet ir buvo sukurta (A. Ryliškis) 11 vaiskrūmių veislių. VU Žmogaus genetikos centre, kuriam vadovauja V. Kučinskas, tiriama Lietuvos gyventojų populiacijos genetinė sandara, kai kurios metabolizmo ligos, įdiegta prenatalinės diagnostikos, molekulinių zondų technologija. Naujagimių genetiniai tyrimai atliekami ir VU Neonatologijos klinikoje (V. Basys).

Žmogaus citogenetiniai ir chromosominių ligų tyrimai vykdomi Kauno medicinos universitete (A. Sinkus). Monografijų iš genetikos srities yra skelbę įvairių žmogaus ligų specialistai J. Lelis (apie paveldimas dermatozes, 1981 m.), J. Avižonienė (apie nervų ir raumenų ligas, 1990), G. Balevičienė (apie psoriazės genetiką).

Molekulinės mikroorganizmų genetikos pradžia buvo Biochemijos institute. Buvo tiriama virusų mutagenezė ir transformacija (J. Rubikas). Šiuo metu garsėja R. Nivinsko vadovaujama laboratorija, kuri tiria bakteriofago T_4 vienos vėlyvųjų genų sankaupos sandarą, veiklą ir valdymą.

Botanikos institute atliekami augalų molekulinės genetikos – DNR pažaidų reparacijos, augalų genų inžinerijos (K. Cieminis, J. Proscevičius), mielių kilerinių kamienų genetikos tyrimai.

Daugiausia molekulinės mikroorganizmų genetikos srityje pasiekta Biotechnologijos institute. A. Janulaičiui vadovaujant, tiriama restrikcijos-modifikacijos sistema, jos komponentų sąveika su DNR, buvo atrastas naujas DNR metilinimo tipas bei daug naujų restrikcijos endonukleazių ir DNR metiltransferazių. Taip pat vykdoma mielių genų inžinerija (K. Sasnauskas). Janulaičio ir jo kolegų darbai labai vertinami kitose šalyse.

Ekologijos institute, Lietuvos gyvulininkystės institute, Lietuvos veterinarijos akademijoje mokslininkų grupės atlieka genetinius gyvulių tyrimus. Antai Ekologijos institute atliekami paukščių imunogenetiniai (A. Sruoga, A. Paulauskas), trematodų citogenetiniai (J. Baršienė) tyrimai. Lietuvos veterinarijos akademijoje (K. Janušauskas, I. Miceikienė) tiriamas gyvūnų polimorfizmas ir citogenetiniai pokyčiai priklausomai nuo ekologinių veiksnių.

Ir žemės ūkio institutuose yra genetikos laboratorijos ar grupės. Lietuvos žemdirbystės institute, o pastaruoju metu ir Lietuvos žemės ūkio universitete atliekami pašarinių augalų biotechnologiniai tyrimai (A. Sliesaravičius). Panašius vaismedžių ir vaiskrūmių tyrimus atlieka Lietuvos sodininkystės institutas (V. Stanys). Pastarajame, kaip ir Lietuvos miškų institute, tiriama atitinkamų augalų kiekybinių požymių

genetika. Lietuvos sodininkystės institute dirbo ir du produktyviausi pokario selekcininkai Ipolitas Štaras (1905–1966), ypač išgarsėjęs obelų veislėmis, ir Jonas Mačys (1908–1980), sukūręs per 30 daržovių veislių. Kai kurios iš jų buvo platinamos už Lietuvos ribų.

Lietuvos žemdirbystės instituto Vokės filialas pagarsėjo bulvių imunogenetikos tyrimais (A. Bujauskas). Sukurtos 6 nematodams ir ligoms atsparios bulvių veislės.

1966 m. buvo įkurta Lietuvos genetikų ir selekcininkų draugija. Pirmuoju jos prezidentu (1966–1977) buvo Jonas Bulavas (1903–1984). Jis buvo vienas ryškiausių Lietuvos pokario selekcininkų, sukūręs 25 javų veisles, ilgą laiką vadovavo Dotnuvos selekcijos stočiai. Taip pat parašė pirmąjį augalų selekcijos vadovėlį (1963 m. 1-oji; 1970 m. 2-oji laida).

Lietuvos genetikų ir selekcininkų draugija organizuoja konferencijas, simpoziumus, kongresus. 1991 m. įkurta Baltijos šalių (Latvija, Lietuva, Estija) genetinių draugijų federacija. Pirmuoju jos prezidentu (1991–1993) buvo V. Rančelis.

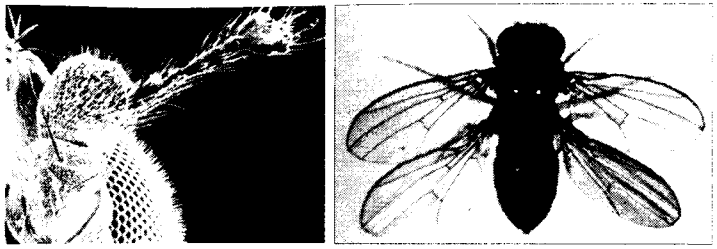
1.4.1. Genetikos metodai

Genetikoje naudojamasi įvairiausiais chemijos, fizikos, matematikos mokslų, kitų biologijos sričių (embriologijos, citologijos, sistematikos) metodais. Tačiau yra metodų, kuriuos apibūdiname kaip genetinius. Jie irgi įvairūs, bet iš jų galima išskirti pagrindinius genetinius metodus

1. Hibridologinis metodas. Jis buvo sukurtas pirmasis. Kaip minėta (žr. 1.3), jį sukūrė Mendelis, bet mokslui atrado de Fryzas, Korensas ir Čermakas. Jo pamatas – dviejų skirtingų paveldimų formų **hibridizacija** (gr. *hybris, -dos* – kraujomaiša), **kryžminimas**. Kryžminimo produktai yra **hibridai** (hibridiniai organizmai), hibridinės ląstelės (kai suliejamos somatinės ląstelės), hibridinės molekulės (kai atliekama DNR molekulinė hibridizacija, kai gaunami hibridiniai genai). Naudojantis šiuo metodu būtina turėti dvi skirtingas, alternatyvias, klasikiniu atveju – to paties požymio (geno) formas, pvz., gyvulius rudos ir baltos spalvos kailiu, augalus geltonos ir žalios spalvos sėklomis ir pan.

Iš tikrųjų tai ne vienas, o grupė metodų. Jie skiriasi priklausomai nuo genetinių tyrimų tikslų. Vienais nustatomi požymio paveldėjimo ypatumai, genų savybės, genų

3. 1313



1.6 pav. **Homeozinės drozofilos mutacijos:**
kairėje – *Antennapedia* (dalis antenos virtusi koja);
dešinėje – *bithorax* (dvi krūtinėlės vietoj vienos krūtinėlės ir todėl dvi poros sparnų vietoj vienos poros sparnų)

sąveika, kitais – geno vieta chromosomoje, tos vietos pakeitimas, treti taikomi norint nuspręsti, ar požymis paveldimas per branduolį, ar per citoplazmos struktūras. Metodas skiriasi ir priklausomai nuo objekto, jo genetinių struktūrų, dauginimosi, lytinio proceso ypatumų, pagaliau nuo objekto genetinės analizės galimybių: ar galima kryžminti grynąsias genetines linijas, ar apskritai galima dirbtinai kryžminti, ar tik tenka apsiriboti tik tuo, kas yra natūralu. Tokia yra gamtinių populiacijų, žmogaus genetikos tyrimų padėtis.

Šiuolaikinėje genetikoje hibridologiniu metodu dažniausiai nustatoma **homologija** (gr. *homologia* – sutikimas), t. y. tapatumas, panašumas, giminingumas. Galima nustatyti genomų, chromosomų ir jų dalių, genų ir jų dalių homologiją.

Antai genomų homologiją (arba nehomologiją) svarbu nustatyti sistematikoje. Tokiais tikslais *Verbascum* rūšis kryžmino M. Natkevičaitė-Ivanauskienė (žr. 1.3). Tiriant žmogaus ir šimpanzės genomų homologiją nustatyta, kad jie beveik nesiskiria (skirtumas 1,5–2,5%).

Tiriant homologiją, galima aptikti tapačių genų tose organizmų grupėse, kuriose jų nesitikėta. Antai žinomos drozofilos mutacijos, kai vietoj vieno organo išsivysto kitas. Pvz., vietoj antenos vystosi koja (*Antennapedia* mutacija) arba dvi poros sparnų, vienam drozofilos segmentui virtus kitu (*bithorax* mutacija). Tokios mutacijos buvo pavadintos **homeozinėmis** (1.6 pav.). Jas detaliau ištyrus paaiškėjo, kad tai mutacijos genų, lemiančių vieną iš pagrindinių vabzdžių morfologijos savybių – kūno segmentaciją. Visi šie genai turėjo tapačią nukleotidų seką. Ji buvo pavadinta **homeo** seka (bloku). Tiriant homologiją, ši seka buvo aptikta ir kai kuriuose žinduolių genuose. Tai buvo netikėtumas. Maža to! Neseniai homologinės homeo sekai nukleotidų sekos aptiktos ir kai kuriuose mielių, augalų genuose.

Genealoginis metodas yra senesnis už hibridologinį metodą, bet jo reikšmė suvokta tik sukūrus pastarąjį metodą. Jau seniai sudarinėjamos karalių, didikų **genealogijos** (gr. *genealogia* – giminės kartų seka). Lietuvoje puikiai išlikusi Radvilų genealogija. Pats terminas geriausiai atskleidžia esmę – sudaroma kartų seka. Genetikoje šiuo metodu tiriama, kaip paveldimas konkretus požymis.

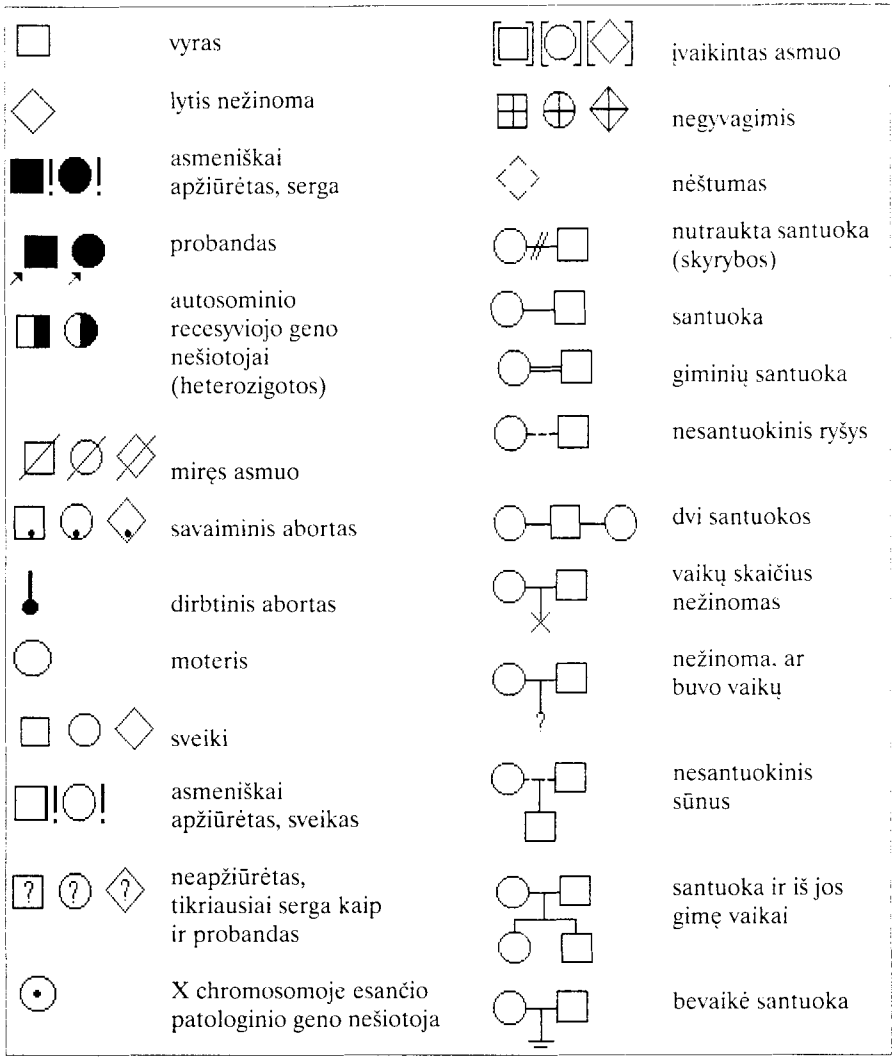
Genealoginiu metodu požymio paveldėjimas buvo tiriamas dar tada, kai jokios genetikos nebuvo. Antai Habsburgų dinastijos „etiketė" buvo „Habsburgų lūpa", tiksliau – išsišovęs apatinis žandikaulis. Oficialiai daltonizmo (spalvų skyrimo defektai), hemofilijos (kraujo nekrešėjimas) paveldėjimo ypatumai nustatyti dar XVII–XVIII a. riboje, bet iš tikrųjų šių požymių, bent hemofilijos, paveldėjimo pobūdis buvo suvoktas labai seniai. Pasak Talmudo, berniukai atleidžiami nuo apipjaustymo, jeigu motinos giminėje buvo nors vienas vyras, sirgęs hemofilija. Mat ši liga paveldima savotiškai. Moterys klasikine tos ligos forma neserga, bet platina požymį (tiksliau – geną). Liga pasireiškia tik jų sūnums, bet ne dukterims. Dukros dažniausiai yra geno platintojos.

Dabar apie tokius požymius kaip hemofilija, daltonizmas sakome, kad tai „sukibę" su lytimi požymiai. Juos lemiantys genai yra tik X chromosomoje (žr. p. 579). Bent apie 100 panašiai paveldimų žmogaus požymių prigimtis buvo pirmiausia nustatyta iš genealogijų.

Oficialiai genealoginis metodas buvo pasiūlytas Galtono (F. Galton). Jis veiksmingas tik tuo atveju, jeigu žinomi **probando** (mus dominančio žmogaus) tėvai ir protėviai (iš motinos ir tėvo pusės) ir kiekvienoje kartoje yra pakankamai palikuonių, taip pat jeigu turima duomenų apie daugelio šeimų genealogijas pagal mus dominantį požymį. Genealoginis aprašas pagrįstas atitinkama ženklų sistema (1.7 pav.). Specialiais matematiniais genealogijų tyrimo metodais nustatomas požymio paveldėjimo pobūdis: ar požymis dominuojantis, ar recesyvusis, atskiro asmens heterozigotiškumas ir kt.

Genealoginis metodas svarbus ir atliekant medicininę-genetinę konsultaciją. Remiantis genealogijų tyrimais galima prognozuoti paveldimos ligos tikimybę tarp probando giminaičių, konkrečiose šeimose. Štai kodėl pastaruoju metu ligos istorijose įrašomi duomenys ir apie giminaičius. Bet, tiesą sakant, šis darbas atliekamas gana atsainiai, matyt, nepakankamai suprantant jo svarbą.

Kita žmogaus veiklos sritis, kurioje taikomas genealoginis metodas, – **gyvulių veislininkystė**. Genealoginis aprašas yra privalomas veislinių gyvulių kokybės ir veislės grynumo dokumentas. Paradoksalu, bet veislinių gyvulių genealogijos ir Lietuvoje vedamos labai rūpestingai,



1.7 pav. **Genealogijų ženklai**

kur kas rūpestingiau negu žmonių. Be to, veislininkystėje šis metodas atskleidžia žalingo geno buvimą veisliniuose gyvuliuose, ir taip išvengiama didelių nuostolių.

Bet apskritai genealoginis metodas visiškai teisėtai yra tarp bendrųjų genetikos metodų. Genealoginė (kartų) analizė atliekama ir naudojantis hibridiologiniu bei mutaciniu metodais.

Mutacinis metodas. Šio metodo autoriais laikytini Morganas ir jo bendradarbiai. Pirmoji genetiniams tyrimams buvo panaudota drozofilos akių spalvos mutacija – baltos, nepigmentuotos akys (*white* – angl. baltas). Palyginus normalaus ir *white* genų paveldėjimą, buvo išaiškinti „sukibę su lytimi" požymiai, jų prigimtis (žr. p. 580). Nuo Morgano laikų mutacijos žymimos angliškais pavadinimais. Tiesa, pastaruoju metu ypač drozofilos genetiką (žr. 1.1 ir 1.2) užplūdo ir kitų kalbų žodžiai, kaip antai *shibire, fushi tarazu* ir pan. (visi japonų k., bet angliškos rašybos).

Mutacinis metodas taikomas įvairiais tikslais:

- kaip hibridologinės analizės pagrindas – sukurti alternatyvias to paties geno atmainas, polimorfizmą;
- normalaus ir mutantinio geno veikimui lyginti, geno arba DNR sekos funkcinei reikšmei nustatyti;
- aptikti naujus genus.

Morganas mutacinį metodą taikė tik pagal pirmąją paskirtį – sukurti pradinį polimorfizmą ir mutantą sukryžminti su normaliu (arba laukiniu) tipu. Taip genetikoje vadinami normalūs individai (požymiai).

Antrasis ir trečiasis taikymo atvejai yra bendrieji biologiniai. Mutacinis metodas taikomas įvairiose biologijos srityse, norint nustatyti, kaip organizme vyksta įvairūs procesai, reiškiniai, atskleisti jų prigimtį, valdymą. Šiems tikslams mutacinį metodą pirmieji labai veiksmingai taikė Bydlis ir Teitumas, tirdami įvairių metabolitų biosintezę.

Vienas **pagrindinių metodinių biologijos principų yra veiklią būseną lyginti su neveiklia.**

Tai daroma dviem būdais.

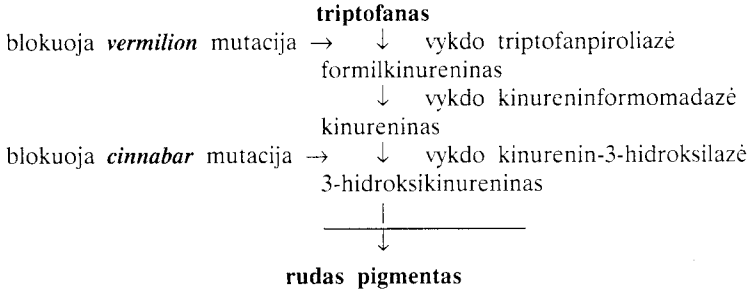
1. **Procesą, reiškinį galima slopinti inhibitoriais**. Antai proflavinas gana selektyviai naikina nebranduolinę DNR (plazmides ir kt.); α-amanitinas slopina eukariotų RNR II ir III polimerazes, bet ne I; chloramfenikolis – bakterijų baltymų sintezę, blokuodamas peptidiltransferazinę reakciją (žr. p. 101); CO slopina reakcijas, kuriose dalyvauja citochromai P-450 (žr. p. 303) ir pan. Tačiau inhibitoriai dažniausiai yra svetimi organizmui junginiai, veikia ir kitus procesus ir yra nuodai.

2. **Procesą, reiškinį gali paveldimai slopinti mutacijos.** Naudojamos ***nul*** **mutacijos**. Tai tokios genų mutacijos, kurioms įvykus geno

veikla visiškai nutrūksta. Didžiausias jų privalumas yra tas, kad pasidaro neveiklus tik vienas konkretus genas. Labai veiksmingai tokio tipo mutacijomis pasinaudojo Bydlis ir Teitumas.

Biocheminės mutacijos, kurias tyrė Bydlis ir Teitumas, slopina kurios nors medžiagos sintezę, bet įvairūs metabolitai organizme sintetinami per tarpines grandis. Kiekvieną jų katalizuoja fermentas, o jį koduoja genas. Taigi vienodai pasireiškiančios biocheminės mutacijos gali būti įvykusios visiškai skirtinguose genuose.

Pateiksime pavyzdį iš drozofilos genetikos. Drozofilos akys paprastai yra tamsiai raudonos. Tačiau akių spalva yra dviejų pigmentų – rudo ir šviesiai raudono mišinys. Rudas pigmentas sintetinamas iš aminorūgšties triptofano per keletą tarpinių reakcijų:



Jei tarpines reakcijas kontroliuojančių kurio iš genų įvyktų *nul* mutacija, t. y. nutrūktų visa įvykių grandinė, akys būtų šviesiai raudonos. Tokios akys yra ir *vermilion,* ir *cinnabar* mutanto. Mutacijų ir kitais genetiniais metodais galima tiksliai nustatyti įvykių (reakcijų) grandinę.

Biocheminės mutacijos yra vienas iš veiksmingiausių būdų biocheminių reakcijų eigai, metabolito sintezei nustatyti.

Ji tiriama taip: a) išskiriama daug vieno požymio mutantų; b) juos ištyrus specialiais metodais (žr. komplementacijos testas, p. 75), nustatoma, kiek genų lemia medžiagos sintezę. Iš to galima apytiksliai spręsti, kiek gali būti tarpinių reakcijų; c) iš anksto numatomos galimos tarpinės reakcijos. Joms patikrinti mutantai paveikiami galimais tarpiniais sintezės produktais. Pvz., drozofilos *vermilion* mutanto akių spalvą normalizuoja formilkinureninas, kinureninas, 3-hidroksikinureninas, o *cinnabar* mutanto tik viena iš šių medžiagų 3-hidroksikinureninas, todėl

reakcijos eiga šioje rudo pigmento sintezės dalyje tokia, kokia pateikta aukščiau.

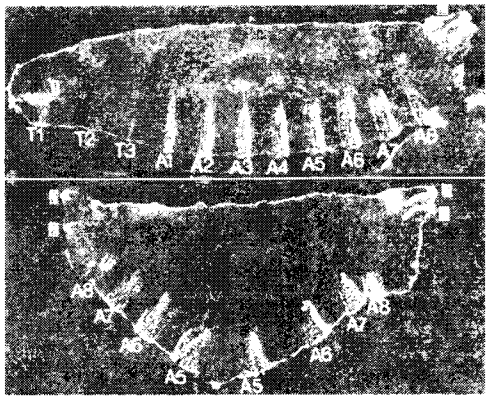
Suprantama, kad, pakitus akių spalvai, drozofila nežus, nors gyvybingumas gali sumažėti. Pakitus gyvybiškai svarbiam procesui, biocheminė mutacija gali būti mirtina, **letali** (lot. *letalis* – mirtinas), tačiau to galima išvengti davus trūkstamos medžiagos. Tai pavyksta padaryti anaiptol ne visų genų mutacijoms. Pavyzdžiui, įvykus DNR polimerazių *nul* mutacijoms, joks metabolitas nepadės. Mutacija bus mirtina, nes nutrūks vienas iš svarbiausių gyvybinių reiškinių – DNR sintezė.

Santykinai mirtinos ir *leaky* mutacijos. Tokios keblios padėties išvengiama dviem būdais, atsižvelgiant į požymio prigimtį.

Pirma, gali būti naudojamos ne *nul* mutacijos, o *leaky* mutacijos (angl. *leaky* – ištekantis, nesandarus). Tai silpniau pasireiškiančios mutacijos. Geno veikla nėra visiškai blokuota, todėl mutantai ar bent dalis jų išgyvena, nors jų gyvybingumas sumažėjęs.

Antra, pasinaudojama **santykinai mirtinomis mutacijomis**. Mutantinis genas yra mirtinas, visiškai nepasireiškia vienokiomis sąlygomis (nepermisinėmis) ir visiškai normaliai veikia kitokiomis sąlygomis (permisinėmis, angl. *permissive* – leidžiąs). Sąlygos, į kurias reaguoja tokio tipo mutantai, gali būti įvairios: pH, osmosinis slėgis, temperatūra. Dažniausiai naudojami **temperatūriniai,** arba *ts*-mutantai (angl. *temperature sensitive* – jautrus t°). Pastarieji labai veiksmingai naudojami naujiems genams, požymiams aptikti, įrodyti. Pavyzdžiu gali būti mutantai *dna*. Tai mutantai, kurie slopina DNR sintezę. Panašiai kaip biocheminių mutantų, gaunama kuo daugiau *ts-dna* mutantų, nustatoma, keliems genams jie priklauso, ir pagaliau, manipuliuojant temperatūra, – ką lemia normalus genas (arba normali mutantinio geno būsena). Mutacijomis aptinkami ir nauji genai. Jeigu pavyko gauti mutaciją, tai yra genas, o jeigu yra genas, tai yra polipeptidas ar bent RNR, kuriuos genas koduoja.

Embrioninės letalės dar neseniai taikytos tik mutageniniams veiksniams įvertinti, o pastaruoju metu labai veiksmingai naudojamos sudėtingiausiems požymiams tirti – morfogenetikoje. Tai mutacijos, mirtinos ankstyviausiose embriono stadijose, kai lemiama bendra organizmo sandara, organų raida. Pavyzdžiui, drozofilos *bicoid* mutacija: du pilveliai iš vieno ir antro galo ir nė vienos galvos (1.8 pav.). Suprantama, kad ji žus labai anksti, vos pradėjusi vystytis. Ištyrus tokias mutacijas, nustatomi genai, lemiantys esmingiausius individualiosios raidos momentus,



1.8 pav. **Normalus (viršuje) ir mutantinis *bicoid* (apačioje) drozofilos gemalai** (pagal C. Nüsslein-Volhard, 1977):
1 – burnos sritis; *2* – užpakaliniai kvėptukai

kaip pvz., *bicoid* atveju nustatoma, kas lemia gradientą „galva – pilvelis".

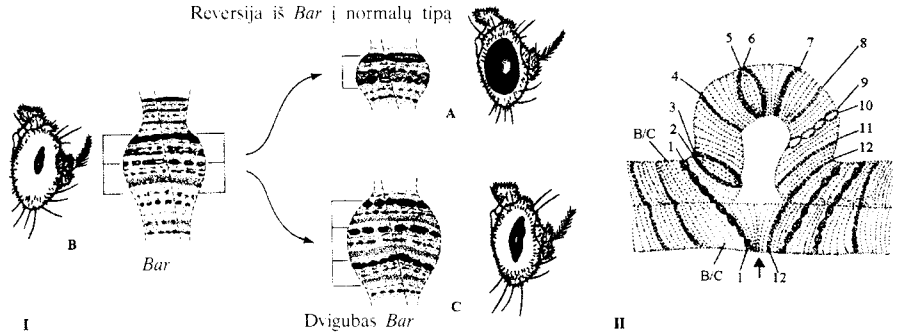
Delecijos. Mutacinio metodo apžvalga nebūtų pakankamai išsami, jeigu nepaminėtume delecijų (angl. *deletion* – išbraukimas, išnaikinimas). Jos būna įvairaus dydžio: didesnių ar mažesnių chromosomos segmentų – kelių genų dydžio, pavienių genų, jų dalių – DNR nukleotidų sekų ar net pavienių nukleotidų iškritos. Šiuo metu delecijos itin populiarios. Jos labai veiksmingai naudojamos konkrečių DNR nukleotidų sekų ir pavienių nukleotidų reikšmei nustatyti. Ar veiks genas, pvz., iškritus TATA sekai? (žr. p. 90). Kokios būtų tokios delecijos pasekmės?

Citogenetinis metodas. Jis sukurtas citologijos ir genetikos mokslų sandūroje. Vizualiniai chromosomų tyrimai įvairių tipų mikroskopais derinami su genetiniais metodais – hibridologiniu, mutaciniu.

Citogenetikos ir citogenetinio metodo raidą labiausiai skatino Morgano mokyklos darbai. Hibridologiniu metodu sudaryti chromosomų genolapiai (linijinis genų išsidėstymas chromosomose), aptikti reiškiniai – genų sankiba, „sukibę" su lytimi požymiai, krosingoveris skatino mokslininkus ieškoti būdų, kaip šiuos reiškinius įrodyti ir tirti citologiniais metodais.

Labai svarbus atradimas buvo **politeninės** (arba **gigantinės**) **chromosomos** drozofilos seilių liaukų ląstelėse (žr. 1.4 pav.).Vėliau jų surasta ir kai kurių kitų organizmų specializuotose ląstelėse.

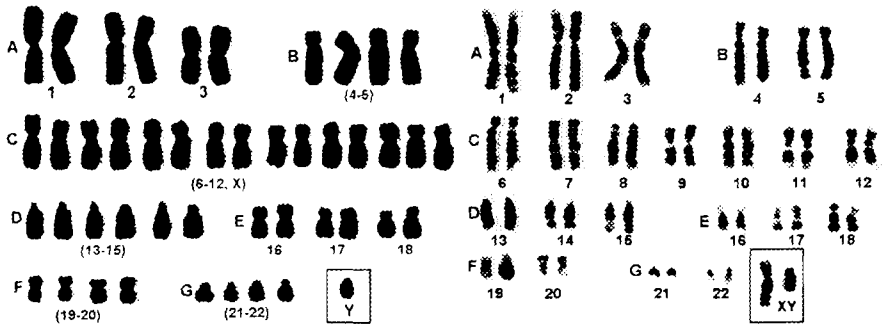
Naudojantis politeninėmis chromosomomis, buvo galima daugelį svarbių genetinių reiškinių padaryti regimais pro mikroskopą. Pirmiausia – visų tipų chromosomų mutacijas (paveldimus chromosomų sandaros pokyčius). Tereikia sukryžminti mutantą, kurio chromosomų sandara yra pakitusi, su normaliu individu. Tokioje padėtyje homologinės chromosomos konjuguoja savitai (žr. p. 428). Pvz., jeigu tai delecija (iškritęs chromosomos segmentas), matytųsi savita kilpa politeninėse



1.9 pav. **Chromosomų mutacijos pastoviai konjugavusiose drozofilos seilių liaukų politeninėse chromosomose:**
I – mutacija *Bar*: *A* – normalus segmentas ir akys, *B* – segmentas padvigubėjęs (duplikacija), *C* – segmentas patrigubėjęs – vadinamasis dvigubas *Bar*, segmentas patrigubėjęs dėl krosingoverio; *II* – delecija iškritęs segmentas apatinėje chromosomoje, tada antrojoje normaliojoje konjugavusioje chromosomoje būna kilpa

1.10 pav. **Žiurkėno (*Cricetulus grisens*) chromosomos, dažytos arlekininiu būdu**: ląstelės paveiktos BrdU, todėl daug sesrinių chromatidžių mainų; kai kurie jų nurodyti rodyklėmis

chromosomose, kurios yra pastoviai konjugavusios ir somatinėse seilių liaukų ląstelėse (1.9 pav., *II*). Politeninėse chromosomose galima įžiūrėti netgi nedidelius, geno dydžio pokyčius. Pavyzdžiu gali būti *Bar* duplikacijos (padvigubėjimai) (1.9 pav., *I*).

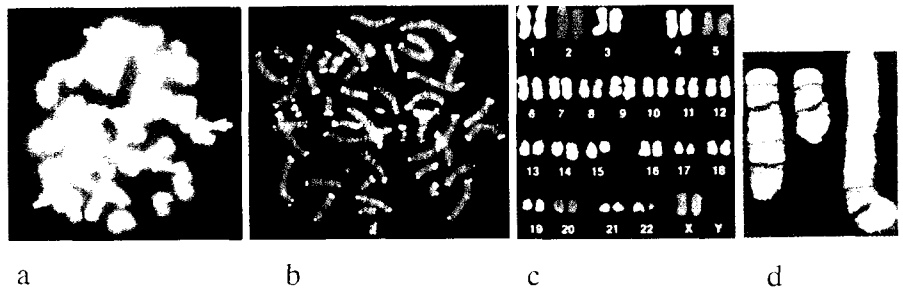


1.11 pav. **Žmogaus (vyro) kariotipas:**
Dviejų dažymo būdų – ištisinio (kairėje) ir diferencinio (dešinėje) palyginimas. Dažant diferenciniu būdu galima atskirti vienodų matmenų chromosomas, pvz., 21-ąją ir 22-ąją

Diferencinis chromosomų dažymas – vienas didžiausių šio šimtmečio citologijos atradimų. Jis yra dviejų tipų. Galima per visą chromosomos ilgį skirtingai dažyti naują ir seną DNR grandines. Tai vadinamasis **arlekininis** dažymas (1.10 pav.). Antras dažymo būdas – **skersinėmis juostomis**, ruožais. Šis būdas kartais žargoniškai vadinamas **bendingu** (angl. *band* – ruožas, juosta). Dažymo būdai labai įvairūs. Tai priklauso nuo to, kokius chromosomos sandaros (per jos ilgį) skirtumus metodas išryškina. Gali tai būti skirtinga chromosomos dalių kondensacija, specifinių DNR sekų ir netgi kurios nors nukleotidų poros (A–T ar G–C) sankaupa.

Kiekviena chromosomų pora šiuo diferencinio dažymo metodu nudažoma skirtingai. Taigi galima nustatyti (identifikuoti) chromosomas, atskirti jas pagal nusidažymo pobūdį (1.11 pav.). Dažant ištisai, dažnai vienos chromosomų poros negalima atskirti nuo kitos dėl jų dydžio ir formos panašumų. Antai žmogaus 21-oji chromosoma, kurios pokyčiai lemia Dauno ligą (žr. p. 425), ištisai dažant nesiskiria nuo 22-osios chromosomos, bet visiškai įmanoma jas atskirti dažant diferenciniu būdu.

Hibridizacija *in situ* (lot. buvimas vietoje) yra labai veiksmingas šiuolaikinės citogenetikos metodas. Jis sukurtas citogenetikos ir molekulinės genetikos sandūroje. **Tai molekulinė hibridizacija ant citologinių preparatų.** Pirmiausia šis metodas pritaikytas 1972 m. žmogaus hemoglobino genų vietai chromosomose nustatyti. Nuo to laiko hibridizacija *in situ* nepaprastai sparčiai tobulėja. Atliekama ne tik



a b c d

1.12 pav. ***In situ*** **hibridizacija (*a*, *b*) ir chromosomų spalvinimas (*c*):**
a – svidrės (*Lolium multiflorum*, skaisčiai rožinė spalva) ir eraičino (*Festuca arundinacea*) tarpgentinio hibrido chromosomos; galima aptikti rekombinantines chromosomas (pažymėta rodyklėmis) (iš M. W. Humpreys, I. Pašakinskienė, A. R. James, H. Thomas, 1998); *b* – žmogaus chromosomų telomeros (iš K. Moyzes, 1991); *c* – žmogaus kariotipas, matyti translokacijos t(3;11), t(14;15) ir t(9;22). Dėl pastarosios atsiranda filadelfinė chromosoma (žr. p. 436) (iš T. Veldman, Ch. Vignon, E. Schröck et al., 1997); *d* – spalvinis diferencijuotas žmogaus 5-osios chromosomos dažymas: kairėje – normali chromosoma, viduryje – su delecija, dešinėje – su insercija (iš I. Chudoba et al., 1999)

DNR sekų, bet ir genų produktų polipeptidų ar RNR hibridizacija *in situ*. Pastaroji ypač svarbi ontomorfogenetikoje. Netolygus morfogenezės genų produktų (RNR, arba baltymų) pasiskirstymas toje pačioje ląstelėje ar tarp dukterinių ląstelių dažnai lemia morfogenezės-ontogenezės eigą (žr. p. 361).

Molekuliniai zondai. Kaip zondas hemoglobino genų vietai nustatyti buvo naudojama žymėta radioaktyviaisiais izotopais hemoglobino mRNR. Dabar zondais naudojamos DNR atkarpos. Kuriami neradioaktyvieji zondai. Jų prisijungimo vieta nustatoma naudojant liuminescencinius dažus arba antikūnus, arba ir viena, ir kita. Molekuliniais baltymų zondais yra antikūnai. Zondo prisijungimo vieta nustatoma liuminiscenciniu mikroskopu.

1996 m. atrastas naujas puikus būdas dažyti chromosomas iš karto keliais fluorochromais (liumenescenciniais dažais) – **chromosomų spalvinimas**. Kiekviena chromosoma nusidažo skirtingomis spalvomis. Labai patogu aptikti chromosomų sandaros pokyčius arba atskirti vieną genomą nuo kito (1.12 pav.). Lietuvoje šį metodą yra įvaldžiusi I. Pašakinskienė.

Zondų technologija iš esmės pakeitė genų ir jų dalių nustatymo strategiją.

Geno ar jo dalies vietą galima nustatyti turint tik jo produktą polipeptidą, be to, nebūtinai to paties organizmo. Technologija tokia: pagal aminorūgščių seką polipeptide iš genetinio kodo lentelės (žr. p. 55) nustatoma nukleotidų seka, kuri turėtų koduoti šį polipeptidą, ir po to automatizuotai sintetinama DNR seka. Ji padauginama polimerazinės grandininės reakcijos būdu (žr. p. 116), žymima fluorescuojančiąja medžiaga ar medžiaga, reaguojančia su antikūnu. Tai ir yra molekulinis zondas. Zondai sintetinami ir nuo RNR matricos. Sintezei naudojamas fermentas atvirkštinė transkriptazė (žr. p. 110).

Zondais gali būti naudojamos nukleotidų sekos, klonuotos iš kitų organizmų, net iš labai tolimų. Tokio zondo pavyzdys yra minėta homeo seka iš drozofilos homeozinių genų.

Dirbtinės chromosomos. Molekulinės genetikos ir citogenetikos sandūroje buvo padarytas dar vienas stambus išradimas – sukurtos dirbtinės chromosomos (žr. plačiau p. 172). Jos naudojamos genomui rekonstruoti ir genų veiklai tirti.

Citogenetinių metodų galimybės didėja tobulėjant ne tik genetiniams metodams, bet ir citologinei įrangai. Lazerinio mikroskopo spinduliu sunaikinamos konkrečios ląstelės ar jų dalys arba chromososmos ar jų dalys. Liuminescenciniu digitaliniu mikroskopu vienu metu nustatoma dviejų skirtingų molekulinių zondų vieta. Televiziniu mikroskopu (arba vadinamąja Nomarskio technika) tiriamos gyvosios ląstelės, o stebėjimai įrašomi į vaizdajuostę. Kai kurių nedidelių organizmų, pvz., nematodo *Caenorhabditis elegans,* įrašyta visa raida nuo zigotos iki subrendusios kirmėlaitės. Kompiuteriniais mikroskopais daugelis citogenetinių tyrimų (chromosomų identifikavimas, sandaros tyrimai, chromosomų pokyčiai ir kt.) atliekami automatizuotai. Pagaliau citofotometru, kuriame tiriamoji medžiaga prateka, galima išskirti konkrečių chromosomų frakcijas.

Matematinis metodas labai rezultatyviai taikytas dar Mendelio. Vėliau jo galimybes praplėtė Galtonas (F. Galton) ir Johansenas (W. L. Johannsen) kiekybinių požymių paveldėjimui tirti. Ypač svarbus matematinis metodas populiacijų genetikai. Galima teigti, kad populiacijų genetika – tai matematinė genetika. Kitose genetikos šakose matematinis metodas irgi labai svarbus. Taip yra, pvz., skaičiuojant, ar nukrypimas nuo Mendelio dėsnių yra priežastinis ar atsitiktinis – dėl nepakankamo ištirtų palikuonių skaičiaus (χ^2, žr. p. 599).

Taigi **šiuolaikinės genetikos ypatybė yra ta, kad reiškiniai, procesai, požymiai tiriami visapusiškai – naudojantis įvairiausiais metodais.** Pavyzdžiui, žmogaus populiacijos tiriamos tokiais metodais kaip polimerazinė grandininė reakcija, molekuliniai zondai ir pan.

1.5.1. Genetikos mokslo reikšmė

Genetikos mokslo reikšmė papasakota aukščiau, be to, ji bus aptariama kituose šios knygos skyriuose, tačiau glaustai ji yra:

1. **Pažintinė** – padeda pažinti, suvokti svarbiausias gyvosios gamtos savybes (paveldimumą, kintamumą, individualiosios raidos mechanizmus).

2. Genetikos mokslai tiria, **kaip paveldimi žmogaus požymiai,** t. y. padeda žmogui pažinti patį save. Kiekvienas žmogus yra šiek tiek genetikas, nes sprendžia, į ką panašūs jo paties, giminių, kaimynų vaikai. Tam tikras genetikos žinių minimumas apie save yra būtinas kiekvienam žmogui.

3. Atskira taikomoji žmogaus genetikos sritis yra **medicininė genetika**. Ji atskleidžia paveldimų ligų esmę, susirgimo tikimybę, galimus gydymo būdus. Paveldimosios ligos, imunitetas yra ne tik žmonių, bet ir žmogaus auginamų naminių gyvūnų bei žemės ūkio augalų problema. Pagaliau mums svarbu ir sveiki miško medžiai, grybai, laukiniai gyvuliai ir kt.

4. **Taikomoji genetika – selekcija** yra labai svarbi žmogaus veiklos sritis. Nesąmoninga selekcija, nors ir vykdoma toliau, negali konkuruoti su genetiniais metodais, specialiai sukurtais naujoms augalų, gyvūnų veislėms, mikroorganizmų kamienams kurti. Be to, naujieji – mutagenezės, poliploidijos, somatinių ląstelių hibridizacijos, genų inžinerijos metodai atveria naujas galimybes keisti, pertvarkyti genomus ir genus.

5. **Genetika yra pagrindas svarbioms ekologijos problemoms, tarp jų pagrindinei ekologijos problemai – organizmo santykio su aplinka problemai spręsti.** Genetiniais metodais nustatomas aplinkos ir vidinių veiksnių genotoksiškumas, numatomos priemonės jam sumažinti ar net visiškai jo išvengti. Taigi genetika atskleidžia atsako į aplinkos poveikį, **adaptacijos mechanizmus.**

II. DNR – GENETINĖ MEDŽIAGA. GENO SANDARA IR VEIKIMAS

2.1. DNR – genetinė medžiaga ir genetinis kodas

Kaip minėta istorinėje apžvalgoje (1.2.3), genetinis kodas yra vienas stambiausių genetikos, ko gero, ir apskritai XX amžiaus mokslo atradimų.

Pagrindiniai geno ir genetinio kodo atradimo momentai yra tokie:

1. Mendelis įrodė, kad yra paveldimumo vienetas genas, o Morganas ir jo bendradarbiai – kad genas yra chromosomos dalis. Todėl visiškai nuoseklus buvo klausimas, o kas yra genas chemiškai? Pradžioje manyta, kad tai baltymas, nes nukleorūgštys buvo labai menkai ištirtos. Net manyta, kad jos nėra polimerai.

Vienas iš teigiamų šio etapo rezultatų – buvo numatytos pagrindinės genetinės medžiagos savybės. Tai stabilumas ir ypatingas sintezės būdas – kopijavimasis. Naujos molekulės turi būti senosios molekulės kopijos.

2. Įrodyta, kad DNR (kai kurių organizmų, pvz., augalinių virusų, – RNR) yra genetinė medžiaga, perduodanti paveldimus požymius. Pirmasis įrodymas buvo bakterijų transformacija. Ją atrado anglų bakteriologas Grifitas (F. Griffith), nustatęs, kad vieną bakterijų kamieną (R) galima paversti (transformuoti) kitu (S), paveikus pastarąjį užmuštomis S kamieno ląstelėmis. Vėliau jau kitų mokslininkų buvo nustatyta, kad transformaciją galima gauti ir S kamieno ekstraktais. Pagaliau 1944 m. Eiveris, Makliaudas ir Makartis ryžosi išaiškinti, kokia medžiaga ekstrakte yra veikli ir sukelia transformaciją. Kad tai DNR, buvo netikėtumas, privertęs naujai ištirti DNR savybes. Taip paaiškėjo, kad DNR yra polimeras, būdinas įvairiems organizmams.

Buvo ir kitų įrodymų, kad **DNR yra genetinė medžiaga**. Heršis ir Čeiz išaiškino, kaip į ląstelę patenka virusas. Pasirodo, kad ne visas, o tik jo vidinė dalis – DNR arba RNR. Nepaisant to, paveldimos visos viruso ypatybės. Frenkelis-Konratas (H. Fraenkel-Conrat), nustatė, kad virusų infekciją galima gauti švelniai išskirtais grynos RNR preparatais. Panašūs bandymai sėkmingai atlikti ir su virusine DNR.

Lemiamas įrodymas, kad DNR yra genetinė medžiaga, buvo jos reikšmės organizmui nustatymas – genetinis kodas, baltymų sintezė.

3. Išaiškinta, kad **DNR yra genetinis kodas.** Nustatyta, kad DNR nukleotidų sekomis koduojamos aminorūgščių sekos polipeptiduose. Kertinis įvykis buvo pati genetinio kodo idėja, kuri priklauso fizikui teoretikui Gamovui. 1954 m. jis kartu su Yču ir Riču paskelbė genetinio kodo hipotezę. Bet, kaip minėta, prieš tai buvo įrodyta, kad genas lemia aminorūgščių seką baltyme. Pirmiausia Bydlis ir Teitumas nustatė, jog 1 genas – 1 baltymas (polipeptidas).

Po to šią idėją ypač sustiprino mutantinių baltymų tyrimai. Mutantiniuose baltymuose yra pakitusi aminorūgščių seka. Tai daugiau ne biologų, o chemijos ir fizikos specialistų Ingremo (V. M. Ingram), Polingo (L. Pauling), Sengerio (F. Sanger) atradimai. Pastarasis surado pirmąjį aminorūgščių sekos baltymuose nustatymo būdą, o Ingremas ir Polingas, be kitų labai stambių ir svarbių baltymų sandaros atradimų, ištyrė paveldimą žmogaus eritrocitų anomaliją – siklemiją.

Siklemija – vienas iš mažakraujystės tipų. Ji taip pavadinta dėl neįprastos pjautuvo (angl. *sicle* – pjautuvas) formos eritrocitų (2.1 pav.). Vieno iš hemoglobino polipeptidų, būtent β-polipeptido, 6-ojoje padėtyje vietoj įprastos normaliam β-polipeptidui glutamo rūgšties yra valinas. Ši savybė stabiliai paveldima. Tas pat yra ir kitų mutantinių baltymų. Vadinasi,

aminorūgščių seka baltyme paveldima.

Taigi genas turi lemti aminorūgščių seką. 1961 m. Nirenbergas ir Matėjus surado būdą genetiniam kodui išaiškinti.

2.1 pav. **Siklemija (pjautuvinė mažakraujystė):** kairėje – normalaus žmogaus eritrocitai, dešinėje – sergančiojo mažakraujyste, homozigotinio žmogaus eritrocitai

4. Nustatyta, kad **DNR sintetinama kopijavimosi būdu**. Tai irgi visų laukta genetinės medžiagos savybė. Pradžia padaryta 1953 m. Vatsono ir Kriko, kurie nustatė, kad DNR sudaryta iš dviejų komplementarių

grandinių, sujungtų tarpusavyje nepatvariais vandeniliniais ryšiais (žr. 1.5 pav.). Pasak jų, grandinės gali lengvai atsiskirti viena nuo kitos, ir, iš aplinkos prie senųjų gandinių jungiantis nukleotidams, gali susidaryti dvi naujos, visiškai tapačios senajai DNR molekulės. DNR sandara garantuoja ne tik sintezę kopijavimosi būdu – replikaciją, bet ir didelį genetinės medžiagos stabilumą.

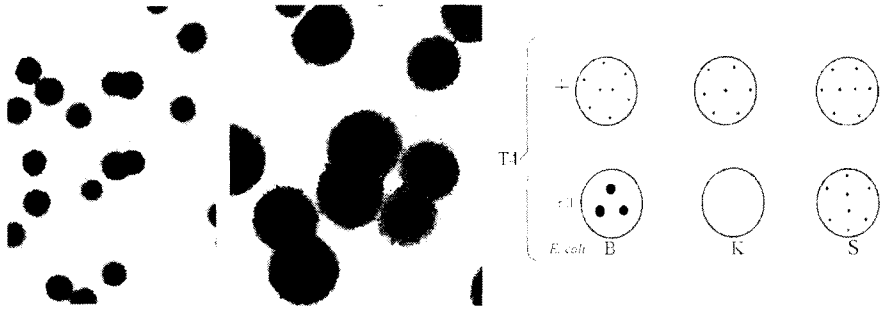
2.1.1. Genetinio kodo hipotezė ir kodonas

Kodavimo hipotezė. 1954 m. Gamovo, Yčo ir Ričo genetinio kodo hipotezėje buvo numatytos visos pagrindinės genetinio kodo ypatybės ir problemos. Pirmoji – **kelių nukleotidų derinys koduoja vieną aminorūgštį**. Pasak hipotezės, vieną aminorūgštį koduoja trijų nukleotidų derinys – **tripletas**, nes aminorūgščių yra 20, o nukleotidų DNR molekulėje – tik 4. Vadinasi, jeigu vieną aminorūgštį koduotų vienas nukleotidas, būtų užkoduotos tik 4 aminorūgštys. Jeigu aminorūgštį koduotų du nukleotidai, tai $4^2 = 16$. Taigi būtų tik 16 derinių. Tačiau derinių po 3 nukleotidus susidaro $4^3 = 64$, todėl neaišku, ar dalis tripletų nekoduoja aminorūgščių (toks kodas būtų neišsigimęs), ar vieną aminorūgštį koduoja keli tripletai, – toks kodas **išsigimęs**.

Šioje hipotezėje buvo keliami dar 3 klausimai:

- ar kodas yra nesanklotinis, ar sanklotinis. Pavyzdžiui, pirmuoju atveju galima būtų skaityti:
  CAT CAT CAT –..., antruoju – CATCAT –...;
- ar kode yra **kableliai**, t. y. nukleotidai, kurie patys nekoduoja aminorūgščių, bet atskiria vieną koduojantįjį ženklą nuo kito;
- ar kodas yra **universalus**, t. y. jis yra visų organizmų vienodas.

Visa tai reikėjo išaiškinti bandymais. Kaip nustatyti daugelį bendrųjų genetinio kodo ypatybių, sugalvojo Krikas, o eksperimentiškai tai išsprendė Breneris (S. Brenner) ir jo bendradarbiai. Jie labai sėkmingai panaudojo bakteriofago T_4 *rII* mutantus, kuriuos gavo paveikę virusus akridino dažais. Šios medžiagos DNR sukelia labai savitus pokyčius: DNR molekulėje viena nukleotidų pora arba iškrinta, arba įsiterpia. Tai **rėmelio poslinkio** (angl. *frameshift*) **mutacijos**. Šiuo atveju kodo skaitymas geno ribose pasislenka viena nukleotidų pora, ir genas tampa neveiklus (*nul* mutacija).



2.2 pav. **Bakteriofago T4 *rII* mutantai:**
dešinėje – *Escherichia coli* testerinių kamienų sistema bakteriofago **T4 *rII*** mutantams identifikuoti; kairėje – dėmės ant *E. coli* B kamieno: *a* – normalaus T4 (smulkios) *b* – *rII* mutanto (stambios)

Testavimo sistema *rII* mutantams atpažinti. Tarp T eilės virusų pasitaiko mutantų, kurie greičiau lizuoja bakterijų sieneles. Jie pavadinti *r* (angl. *rapid* – greitas, smarkus). Šiuos mutantus galima dar detaliau sugrupuoti pagal tam tikrus *E. coli* kamienus **B, K** ir **S** (2.2 pav.). Išauginama *E. coli* kultūra taip, kad ištisiniu sluoksniu dengtų Petri lėkštelės paviršių. Susidaro vadinamasis gazonas. Ten, kur ant gazono pakliūva bakteriofagas T_4, atsiranda dėmė, nes virusas lizavo („išėdė") *E. coli* ląsteles. Normalus T_4 bakteriofagas visus šiuos kamienus lizuoja vienodu tempu. Atsiranda smulkios dėmės (nelabai aiškiais kraštais, paveiksle neparodyta). K grupės kamienų *rII* mutantai visai nelizuoja (K yra kamienų grupė), o S kamieną lizuoja normaliai. Stambios dėmės susidaro *rII* užkrėtus *E. coli* B kamieną. Taip *rII* mutantai atskiriami nuo kitų *r* mutantų (*rI, rIII*). Šią bakteriofago T_4 *rII* aptikimo sistemą ir viruso genetinės analizės pagrindus sukūrė Benzeris. Ypač svarbus genetiniam kodui tirti buvo komplementacijos testas. Šis testas buvo anksčiau sukurtas aukštesniųjų organizmų genų funkcinei sandarai tirti (žr. p. 75). Siekdamas tų pačių tikslų, Benzeris jį pritaikė virusams. Juo galima nustatyti, keli genai (funkciniai vienetai) lemia požymį.

Konkrečiai bakteriofago T_4 *rII* rajonui tirti komplementacijos (cis-trans-) testas buvo taikomas taip: 1. Sukurta didelė bakteriofago T_4 *rII* mutantų kolekcija. Visi mutantai buvo vadinamieji savarankiški, t. y. jų kilmė buvo nepriklausoma, pvz., išskirti iš skirtingų

4. 1313

kultūrų ir pan. Per 10 veiklos metų, nuo 1953 m., Benzerio kolekcijoje savarankiškų *rII* mutantų susidarė per 2 tūkstančius. 2. Dviem savarankiškais *rII* mutantais buvo užkrečiama ta pati *E. coli* K kamieno kultūra. 3. Pagal komplementacijos testą, kai panašiai atrodančios mutacijos yra skirtingų genų (funkcinių vienetų), mišrioje kultūroje turėtų pasireikšti normalus požymis. Taigi *E. coli* K kamieno gazone turėtų atsirasti smulkios dėmės. Kai *rII* mutantai yra to paties funkcinio vieneto, turėtų pasireikšti mutanto savybės. Tada ant *E. coli* K kamieno gazono visai nebūtų dėmių.

Šitaip atlikus analizę, visus bakteriofago T_4 *rII* mutantus teko suskirstyti į dvi grupes. Taigi *rII* rajoną reikia dalyti į dvi dalis, į du funkcinius vienetus (genus). Benzeris juos vadino cistronais (nuo cis-trans-testo). Tačiau dabar vėl sugrįžta prie klasikinio paveldimumo vieneto pavadinimo **genas**.

Benzeris bakteriofago T_4 *rII* mutantams pritaikė dar vieną aukštesniųjų organizmų genetikos metodą (žr. p. 258) – tirti vieną iš rekombinacijos tipų – krosingoverį ir pagal jį nustatyti mutacijų vietą gene (chromosomoje). Bakteriofago T_4 rekombinacija irgi buvo tiriama užkrečiant tą pačią *E. coli* kultūrą dviem savarankiškais to paties geno *rII* mutantais (patikrintais komplementacijos testu). Retkarčiais užkrėtus to paties geno dviem *rII* mutantais, atsirasdavo normaliai K kamieną lizuojančių virusų. Atsiradę pokyčiai buvo paveldimi, todėl buvo nuspręsta, kad normalūs virusai – rekombinacijos rezultatas. Tuo tarpu komplementacija yra laikinas reiškinys. Jis trunka tik tol, kol du nealeliniai genai sąveikauja tarpusavyje.

Breneris ir jo kolegos tiesiogiai naudojosi Benzerio tyrimais. Jie tyrė krosingoverį, todėl buvo svarbu, kad *rII* mutantai būtų to paties funkcinio vieneto. Primename, visi genetinio kodo analizei naudoti *rII* mutantai buvo gauti paveikus bakteriofagą T_4 akridino dažais. Dėl šių mutagenų iškrinta ar įsiterpia nukleotidų pora.

Kodonas. Kaip minėta, tos genų mutacijos, kurioms įvykus gene iškrinta ar į jį įsiterpia viena nukleotidų pora, vadinamos (**skaitymo**) **rėmelio poslinkio mutacijomis**. Tokio pavadinimo prasmę ir kitus kodo pokyčius lengva suvokti užrašius DNR Kriko pasiūlytu pusiau humoristiniu būdu CAT CAT CAT – ..., (angliškai „katė“ „katė“ „katė“...). Genetiškai šios „katės“ – nesąmonė, bet toks rašymo būdas labai padeda suvokti įvairias situacijas.

Tarkime, kad gene įvyko iškrita (iškrito nukleotidų pora):

C

CAT↑ATC ATC ATC ATC AT–... (iškrita)
(kodas sutrikęs)

arba intarpas (įsiterpė nukleotidų pora)

T
↓

CAT CTA TCA TCA TCA–... (intarpas)
(kodas sutrikęs)

Abiem atvejais nuo pažaidos vietos visų tripletų skaitymas pasislenka per vieną nukleotidą. (Priimama Gamovo ir kt. hipotezė, kad vieną aminorūgštį koduoja 3 nukleotidų derinys.) Štai kodėl šios mutacijos vadinamos rėmelio poslinkio mutacijomis.

Kriką sudomino tai, kad, kryžminant mutantus tarpusavyje, kartais rekombinantai yra mutantinio požymio – *rII*, o kartais normalūs. Jam kilo mintis, kad šis reiškinys priklauso nuo to, kokio ženklo *rII* mutantai tarpusavyje kryžminami. Kai kryžminami du tokio paties ženklo mutantai, kurių pakitusiame gene iškritusi (–) nukleotidų pora, gaunamas rekombinantas su dviem iškritomis:

C A

CAT↑ATC ATC↑TCA TCA T–... (dvi iškritos)
(kodas sutrikęs)

o sukryžminus du mutantus, abu su intarpu (+), gaunamas rekombinantas su dviem intarpais:

T A
↓ ↓

CAT C(T)A TCA (A)TC ATC ATC AT–... (du intarpai)
(kodas sutrikęs)

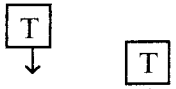
Abiem atvejais kodas sutrikęs. Kitaip yra, kai pavyksta sukryžminti du skirtingų ženklų mutantus – iškrita ir intarpas (– ir +):

C T
↓

CAT↑ATC (T)AT CAT CAT CAT–... (iškrita ir intarpas)
(Kriko reversija)

arba

intarpas ir iškrita (+ ir –):



CAT C(T)A TCA↑CAT CAT CAT–... (intarpas ir iškrita)
(Kriko reversija)

Abiem atvejais (iškrita ir intarpas arba intarpas ir iškrita) gaunami rekombinantai, kurių kodas gene tik labai mažoje dalyje (jeigu pažaidos yra viena arti kitos) sutrikęs, vėl atsistato CAT CAT CAT–...

Panašūs dalykai gali vykti ir dėl mutacijų, pakartotinai paveikus rėmelio poslinkio mutantus akridino dažais. Dvigubų to paties ženklo mutantų (iškrita ir iškrita, – ir –, arba intarpas ir intarpas, + ir +) kodas bus sutrikęs, o priešingo ženklo dvigubų mutantų (iškrita ir intarpas, – ir +, arba intarpas ir iškrita, + ir –) kodo skaitymas atsistatys. Tai viena iš grįžtamųjų mutacijų rūšių. Kadangi jas pirmasis išaiškino Krikas, tai šio tipo grįžtamosios mutacijos vadinamos **Kriko reversijomis**. Taip vieną DNR pažaidą neutralizuoja antra tame pačiame gene, tik kitoje vietoje.

Pagal aukščiau išdėstytas rekombinantų ypatybes – ar rekombinanto požymis normalus (+ – arba – +) ar mutantinis (– – arba + +), – visus rėmelio poslinkio mutantus galima suskirstyti į dvi grupes: + (intarpas) ir – (iškrita). Taip ir buvo padaryta su bakteriofago T_4 *rII* mutantais.

Šis mutantų grupavimas ir pravertė tirti genetinį kodą, pirmiausia nustatyti, kelių nukleotidų derinys koduoja vieną aminorūgštį. Nuosekliai kryžminant buvo gauti rekombinantai su įvairiu to paties ženklo pažaidų skaičiumi.

Pirmiausia tarpusavyje buvo sukryžminti du vienodo ženklo rekombinantai (2.3 pav.). Rekombinantas turėjo arba dvi iškritas (2.3 pav., *A*) arba du intarpus (2.3 pav., *B*). Kodas buvo sutrikęs. Rekombinantų požymis mutantinis (*rII*). Po to tokie rekombinantai vėl kryžminti su atitinkamu (iškrita arba intarpas) mutantu.

Rezultatai patvirtino tai, ko tikėjosi Krikas. Kai visi trys mutantai to paties ženklo, rekombinanto su trimis pažaidomis kodas atsistatė, ir požymis buvo normalus (2.3 pav., *A* arba *B*). Tik svarbu, kad visos pažeistos vietos būtų arti viena kitos, nes genas nuo pirmosios iki trečiosios pažaidos yra pakitęs. Kriko reversija gali įvykti tik tada, kai pažeista nedidelė geno dalis.

A. TRYS IŠKRITOS

Du mutantai

CAT↑ATC ATC ATC ATC AT- (kodas sutrikęs)

ir

CAT CAT C↑TC ATC ATC AT- ... (kodas sutrikęs)

Jų rekombinantas:

CAT ATC TCA TCA T- ... (kodas sutrikęs)

Trečiasis mutantas

CAT CAT CAT↑ATC ATC AT- (kodas sutrikęs)

Trijų mutantų rekombinantas

CAT↑ATC↑T↑AT CAT CAT CAT- ... (kodas atsistato)

B. TRYS INTARPAI

Du mutantai

CAT C(T)A TCA TCA TCA T- ...(kodas sutrikęs)

ir

CAT CAT C(C)A TCA TCA TCA T- ...(kodas sutrikęs)

Jų rekombinantas

CAT C(T)A TC(C) ATC ATC- ...(kodas sutrikęs)

Trečiasis mutantas

CAT CAT CAT(A)CA TCA TCA T- ...(kodas sutrikęs)

Trijų mutantų rekombinantas

CAT C(T)A TC(C) AT(A) CAT CAT CAT- ...(kodas atsistato)

2.3 pav. **Nuosekli rekombinacija tarp trijų to paties ženklo mutantų:** kodas atsistato, kai likusioje geno dalyje vėl skaitomos „katės" CAT CAT CAT- ...; užrašyta tik viena DNR grandinė; įsiterpę arba iškritę nukleotidai kvadrate

Tai, kad iš karto iškritus arba įsiterpus 3 nukleotidams atsistato kodas, įrodo, jog vieną aminorūgštį koduoja trijų nukleotidų derinys. Iškritus arba įsiterpus tik vienam koduojančiam nukleotidų deriniui, genas bus tik iš dalies pažeistas, o iškritus arba įsiterpus mažiau ar daugiau už koduojantį derinį nukleotidų, gene sutrinka visų po pažeistos vietos esančių kodonų atpažinimas.

Trijų nukleotidų derinys, kuris koduoja vieną aminorūgštį, vadinamas **kodonu.**

Mutacijų metodu taip pat buvo įrodyta, kad geno viduje nėra kablelių ir kad kodas yra nesanklotinis.

2.1.2. Genetinio kodo išaiškinimas ir patikrinimas biocheminiais metodais

Genetinio kodo išaiškinimas. 1961 m. Nirenbergas ir Matėjus surado būdą, kaip išaiškinti, kokias aminorūgštis koduoja konkretūs kodonai.

Pasinaudota vadinamąja neląsteline sistema. Tai frakcija, kuri lieka nusodinus ultracentrifuguojant visus organoidus, išskyrus ribosomas. Pridėjus į ją ATP (būtinas energijos šaltinis), žymėtųjų aminorūgščių ir virusinės RNR, vyko polipeptido sintezė. Kontrolei panaudojus dirbtinį poliribonukleotidą, sudarytą vien iš uridilo rūgšties – **poli U (poliuridilo rūgštis)**, taip pat vyko polipeptido sintezė. Bet polipeptidas buvo tik iš **fenilalanino**. Bandant kitus dirbtinius poliribonukleotidus, kurie buvo susintetinti panaudojus Očojos (S. Ochoa) išskirtą fermentą poliribonukleotidfosforilazę, ištirti visi 64 tripletiniai nukleotidų deriniai (2.1 lentelė). Iš jų tik 3, būtent **UAA, UAG** ir **UGA**, nekoduoja jokių aminorūgščių. Jie buvo pavadinti **beprasmiais (nonsensais)**. Apie juos bus rašoma toliau.

RNR polimerazės sintetina RNR iš ribonukleozidtrifosfatų tik esant matricai (DNR arba RNR), todėl nukleotidų seka yra iš anksto užprogramuota. Poliribonukleotidfosforilazė sintetina poliribonukleotidus iš ribonukleoziddifosfatų be matricos, atsitiktinai, bet kokia tvarka, todėl kodą aiškinti teko su skaičiavimo mašina. Apskaičiuota, pagal kokią tikimybę gali susidaryti įvairūs tripletai, keičiant įvairių nukleotiddifosfatų santykį. Rezultatai lyginti su aminorūgščių įjungimo į naują polipeptidą santykiu. Žinoma, toks kodas kėlė abejonių ir jį reikėjo patikrinti įvairiais metodais.

2.1. lentelė. **Universalusis (prokariotų chromosomos ir eukariotų branduolio chromosomų) genetinis kodas**

Pirmoji padėtis 5′-galas	**Antroji padėtis**								**Trečioji padėtis** 3′-galas
	U	ar	C	ar	A	ar	G	ar	
U	UUU		UCU		UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC		UGC		C
	UUA		UCA		UAA		UGA	Term	A
	UUG	Leu	UCG		UAG	Term	UGG	Trp	G
C	CUU		CCU		CAU	His	CGU		U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU		ACU		AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU		GCU		GAU		GGU		U
	GUC		GCC		GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA		GGA		A
	GUG		GCG		GAG	Glu	GGG		G

Kodo tikrinimas biocheminiais metodais. Susintetinti žinomos nukleotidų sekos poliribonukleotidus ir juos panaudoti kodui patikrinti pavyko Koranai (H. G. Khorana). Jis cheminiu būdu sintetino nedidelius (tri- tetra-) oligonukleotidus, po to juos jungdavo į didesnius oligonukleotidus (mažuosius segmentus po 4–6). Pasirodo, tokių oligonukleotidų (sudarytų iš vienos grandinės) pakanka kaip matricos DNR polimerazei. Su šiuo fermentu gautos dirbtinės DNR – polimerai iš dviejų grandinių su žinoma nukleotidų seka. Tokios DNR panaudotos kaip matricos RNR sintetinti, o šios – „neląstelinėje sistemoje“ kodui patikrinti.

Pailiustruosime šias manipuliacijas konkrečiu pavyzdžiu. Susintetintas oligonukleotidas $(\mathbf{TTC})_{4-6}$. Jis naudotas kaip matrica DNR sintetinti:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{T-T-C...} \\ | \quad | \quad | \\ \mathbf{A-A-G...} \end{bmatrix}_{n}$$

Ši DNR toliau naudota kaip matrica iš karto dviem skirtingoms RNR sintetinti. Mat gyvoje ląstelėje nuo DNR sintetinasi tik viena RNR (fiksuota kryptimi, nuo 5′-galo link 3′-galo) – nuo vienos DNR

grandinės, o kita DNR grandinė reikalinga replikacijai. Izoliuotose sistemose RNR sintezė nereguliuojama, ir nuo kiekvienos DNR grandinės sintetinasi dvi skirtingos RNR, būtent:

```
RNR 5′  -A-A-G-A-A-G-A-A-G-3′-...
            |
            T-T-C-T-T-C-T-T-C-...
DNR         | | | | | | | | |
            A-A-G-A-A-G-A-A-G-...
                              |
RNR...-3′ -U-U-C-U-U-C-U-U-C-5′
```

Su kiekviena šių RNR yra patikrinami 3 kodonai, nes izoliuotoje sistemoje RNR nėra tiksliai fiksuotos atpažinimo pradžios, ir polipeptido sintezė gali prasidėti arba pirmu, arba antru, arba trečiu nukleotidu; kiekvienu atveju bus skirtingi kodonai, pavyzdžiui, **AAG** arba **AGA**, arba **GAA**:

A-A-G-A-A-G-A-A-G-A-A-G-A-A-G-...
arba
A-A-G-A-A-G-A-A-G-A-A-G-A-A-G-...
arba
A-A-G-A-A-G-A-A-G-A-A-G-A-A-G-...

Taigi visiems 64 kodonams patikrinti reikėjo susintetinti tik 11 pradinių oligonukleotidų.

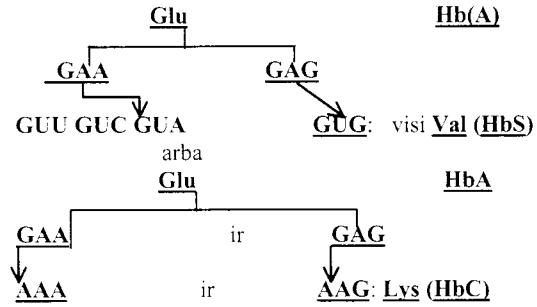
2.1.3. Kodo patikrinimas genetiniais metodais

Genetiniam kodui patikrinti naudoti mutantiniai baltymai, kurių išaiškinta aminorūgščių seka, t. y. pirminė sandara. Tai tabako mozaikos viruso kapsido baltymas, triptofansintazė, bakteriofago T_2 galvutės baltymas ir kt. Gene gali pasireikšti trijų tipų mutacijos, kurios pakeičia baltymo sintezę ir sandarą: ***misens*, *nonsens* ir rėmelio poslinkio**. Pagal jas buvo tikrintas kodas.

***Misens* mutacijos** (angl. *missense* – klaidinga prasmė) būna tada, kai baltyme vietoj vienos aminorūgšties yra kita aminorūgštis. Šias mutacijas galima ir kitaip apibūdinti: tai geno pokyčiai, kai viena nukleotidų pora kodone pakeista kita, ir kodonas koduoja kitą aminorūgštį.

Misens mutacijos yra ir mutantiniai hemoglobinai S ir C. Hemoglobino S β-polipeptide 6-oje padėtyje glutamo rūgštis pakeista valinu, o hemoglobino C – tame pačiame β-polipeptide tik 7-ojoje padėtyje vietoj glutamo rūgšties yra lizinas.

Tikrinant kodą reikia nustatyti, ar galimas perėjimas iš kurio nors glutamo rūgšties kodono atitinkamai į valino ar lizino kodonus, pakeitus glutamo rūgšties kodonuose vieną nukleotidą kitu:



Taigi GAA ir GAG kodonuose pakeitus jų antrąjį **A** nukleotidą **U** nukleotidu, susidaro valino kodonai GUA ir GUG, o pakeitus glutamo rūgšties kodonų pirmąjį **G** nukleotidą **A** nukleotidu, susidaro lizino kodonai AAA ir AAG. Panašiai patikrinta daugybė įvairių organizmų baltymų. Dažniausiai perėjimas iš vieno kodono į kitą pakeičiant vieną nukleotidų porą kita buvo įmanomas.

***Nonsens* mutacijos** (angl. *nonsense* – niekai, nesąmonė). Vienai nukleotidų porai keičiantis kita, kodonas, kuris anksčiau kodavo kurią nors aminorūgštį, gali virsti beprasmiu.

Nonsens mutacijos inaktyvina geną. Baltymo sintezė nutrūksta, nes polipeptidinė grandinė sintetinama tik iki pirmojo beprasmio kodono.

Tad įvykus *nonsens* mutacijai, pasigamina didesnės ar mažesnės neveiklios polipeptidinės atkarpos. Priklausomai nuo to, koks beprasmis kodonas susidaro, šios mutacijos vadinasi:

UAA – *ochre*; UAG – *amber*; UGA – *opal*

Nonsens mutacijų reversijas sukelia alkilinančiosios medžiagos. Tuo jas galima atskirti nuo rėmelio poslinkio mutacijų, kurios taip pat inaktyvina geną, bet jas revertuoja akridino dažai. Įvykus grįžtamajai

mutacijai, į pirminę nukleotidų seką gene labai retai grįžtama. Kad polipeptidas vėl būtų sintetinamas, pakanka iš beprasmio kodono susidaryti kokios nors aminorūgšties kodonui. Tad revertanto (organizmo, kuriame įvykusi grįžtamoji mutacija) baltyme, palyginti jį su pradiniu baltymu, dažniausiai būna kuri nors kita aminorūgštis, pvz.:

UGG – Trp (pradinis baltymas)
↓
UAG – *amber* (baltymas nesintetinamas)
↓
AAG – Lys (revertanto baltymas)

Kai kodui tikrinti naudojami *nonsens* mutantai, pirmiausia gaunami revertantai, po to žiūrima, ar galimas perėjimas iš esančios normaliame (pradiniame) baltyme aminorūgšties kodono (pvz., triptofano) per *nonsens* mutantą (pvz., *amber*) į kodoną, kuris revertanto baltyme koduoja kitą aminorūgštį (pvz., liziną) vis keičiant vieną nukleotidą kitu. Triptofano kodonas yra tik vienas:

Trp – UGG
↓
Nonsensas – UAG (*amber*)
↓
Lys – du AAG ir AAA

Šiuo atveju perėjimas iš triptofano į lizino kodoną yra galimas.

Supresorinės tRNR mutacijos. Mutacijos gali vykti bet kuriuo metu bet kuriose ląstelėse ir bet kuriuose genuose. Taigi ir genuose, koduojančiuose tRNR. Detaliai ištirtos tRNR antikodono nukleotidų mutacijos.

Pernašos RNR atlieka dvi viena nuo kitos atsijusias funkcijas. Ir abi specifines – tik konkrečiai aminorūgščiai. Pirmoji – prie tRNR specifiškai ir labai tiksliai prijungiama konkreti aktyvinta aminorūgštis (žr. 2.3.3). Antroji – tRNR su prijungta aminorūgštimi atpažįsta vietą ant mRNR. tRNR yra 3-jų nukleotidų seka, vadinama **antikodonu.**

Antikodono nukleotidų seka tRNR yra komplementari mRNR kodono nukleotidų sekai.

Pavyzdžiui, triptofano kodonas yra **UGG**, triptofano tRNR (Trp-tRNR) antikodonas yra **ACC**.

***Misens* ir *nonsens* mutacijų supresoriai.** Bet kurios tRNR gene dėl mutacijos viena nukleotidų pora bet kurioje vietoje (ir antikodone) gali būti pakeista kita. Pakitus antikodonui, tRNR kontaktuoja ne su tuo kodonu, kuris koduoja prijungtą prie tRNR aminorūgštį, o su kitu, kurio nukleotidų seka komplementari mutantiniam antikodonui. Kaip minėta, dvi tRNR funkcijos viena nuo kitos atsijusios. Dėl šios priežasties mutacija tRNR gene gali slopinti mutaciją gene, koduojančiame baltymą.

E. coli triptofansintazės gene buvo aptikta *misens* mutacija su triptofanu (**Trp**) vietoj glicino (**Gly**) normaliame baltyme:

normalus tipas – Gly kodonas GGG
↓
***misens* mutacija – Trp kodonas UGG**

Tačiau aptikta Gly-tRNR mutacija, kuri **UGG** kodoną (**Trp**) atpažino kaip **Gly**. Jos antikodone buvo **ACC** seka kaip **normalios Trp-tRNR**. Šio reiškinio priežastis tokia: **Gly-tRNR** antikodone įvyko mutacija: viena nukleotidų pora buvo pakeista kita:

normali Gly-tRNR – antikodonas C C C
↓
mutantinė Gly-tRNR – antikodonas A C C

Dėl mutacijos tRNR gene antikodono seka gali pakisti ir taip, kad būtų komplementari kuriam nors beprasmiam kodonui. Tada ši tRNR beprasmio kodono vietoje pastatys atitinkamą aminorūgštį, ir baltymo sintezė *nonsens* mutante nenutrūks. Tik baltyme vietoj vienos aminorūgšties gali būti kita. Bet baltymas bus sintetinamas, o tai ir yra svarbiausia.

Tačiau tokio tipo reversija yra visiškai kitokios prigimties, negu iki šiol nagrinėtos reversijos. Tai dviejų genų sąveikos rezultatas. Abu genai mutantiniai. Vienas genas su *nonsens* mutacija, o kito – tRNR geno mutacija įvykusi antikodone. Pastarojo geno koduojama tRNR slopina *nonsens* mutaciją. Tad vieno geno (tRNR) mutacija slopina kito geno (mRNR) mutaciją.

Tokia genų sąveika, kai vienas nealelinis genas slopina kitą nealelinį geną, vadinama **epistaze** (gr. *epi* – ant, virš + *stasis* – stovėjimas), arba **supresija** (lot. *pressus* – slėgimas). tRNR antikodono mutacijos, slopinančios **nonsens** mutacijas, vadinamos **supresorinėmis.**

Genai, slopinantys mutacijas kituose nealeliniuose genuose, vadinami **tarpgeniniais (nealeliniais) supresoriais**, arba **slopinančiaisiais genais**. Jie žymimi ***sup*** (arba ***su***).

***Nonsens* supresorių taikymas kodui tikrinti.** Dažniausiai dėl beprasmio kodono slopinimo yra sintetinamas baltymas su pakeista aminorūgštimi nonsenso vietoje. Tik retsykiais arba specialiai parinkus supresorių beprasmio kodono vietoje bus įjungiama tiksliai tokia pati aminorūgštis, kaip ir normalaus geno koduojamajame baltyme.

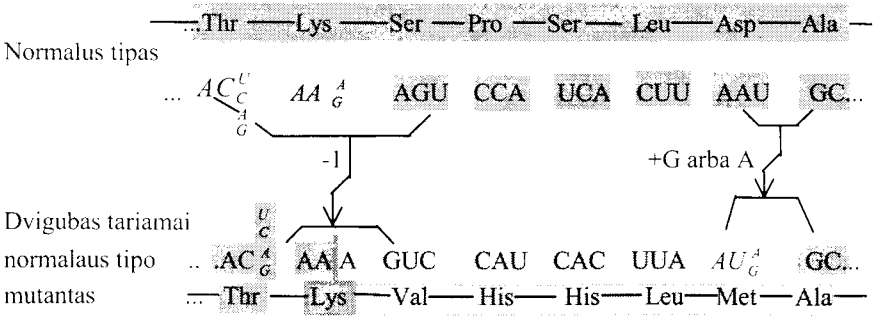
Naudojant šio tipo supresorius kodui tikrinti žiūrima, ar galimas perėjimas iš antikodono tos aminorūgšties, kuri aptikta baltyme esant genotipe supresoriui, į antikodoną, atpažįstantį beprasmį kodoną, pakeitus vieną nukleotidų porą kita. Pavyzdžiui, kai nonsensas perskaitomas kaip leucino kodonas ir į baltymą įjungiamas leucinas, žiūrima, ar galimas perėjimas iš leucino antikodono **AAC** į nukleotidų seką **AUC**, komplementarią beprasmiam kodonui **UAG**:

AAC
↓
AUC

Į to paties beprasmio kodono vietą gali būti atgabentos įvairios aminorūgštys. Tai priklauso nuo to, koks yra supresorius.

Rėmelio poslinkio mutacijos. Kaip minėta, įvykus šioms mutacijoms, nesintetinamas baltymas, nes, nukleotidų porai iškritus iš geno arba į jį įsiterpus, sutrinka visų po pažaidos kodonų skaitymas. Be to, gene atsiranda beprasmiai kodonai. Tokių mutacijų reversijas sukelia akridino dažai, kai netoli nuo pirmosios pažaidos atsiranda antra, priešingo ženklo rėmelio poslinkio mutacija. Žinoma, revertanto kode nuo vienos pažaidos iki kitos koduojama pakitusi aminorūgščių seka (2.4 pav.).

Tikrinama, ar šiame ruože galimas perėjimas iš vienų aminorūgščių kodonų į kitų aminorūgščių kodonus dvigubajame mutan-



2.4 pav. **Kriko reversija – iškrita ir intarpas bakteriofago T_4 gene, koduojančiame lizocimą** (pagal M. Yčą, 1971)

te, jeigu vienoje vietoje iškristų, o kitoje įsiterptų nukleotidas (arba atvirkščiai).

2.1.4. Bendras genetinio kodo apibūdinimas

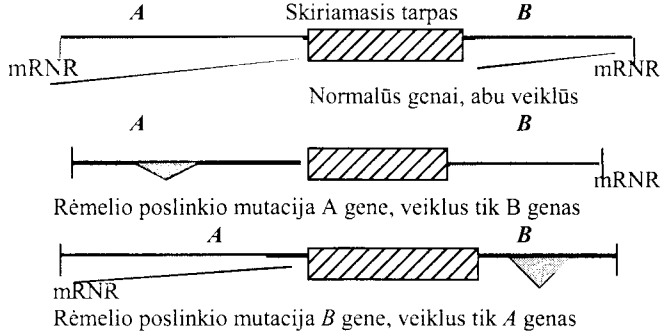
Kodas išsigimęs. Iš 64 tripletų, kurie susidaro derinantis įvairiais deriniais keturiems nukleotidams po tris, 61 tripletas koduoja aminorūgštis (žr. 2.1 lentelę). Tai galutinai įvairiais metodais patikrinti duomenys. Taigi

kodas išsigimęs, nes vienai aminorūgščiai gali tekti keli kodonai.

Daugiausia jų (po 6) koduoja leuciną, seriną ir argininą, o triptofaną ir metioniną – tik po vieną kodoną. Dažnokai viena aminorūgštis 2.1 lentelėje užima visą kvadratą. Šiais atvejais trečiasis nukleotidas kodone gali būti bet kuris iš keturių nukleotidų: **U**, **C**, **A** ar **G**. Vis tiek bus koduojama ta pati aminorūgštis. Tad dažniausiai išsigimęs trečiasis nukleotidas. Tik vienu atveju kodo išsigimimą lemia 1-asis ir dviem atvejais 2-asis nukleotidai.

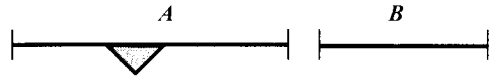
Kablelių problema. Kableliai tarp genų. Kablelių problema kur kas sudėtingesnė negu manyta. Kad vieną geną nuo kito skiria specialios nukleotidų sekos, pirmieji nustatė Benzeris ir Čampas (S. P. Champe). Jie aptiko bakteriofago T_4 mutantą, kurio *rII* rajone iškritusi (įvykusi delecija) nukleotidų seka tarp *A* ir *B* genų. Tokie genai yra sulieti. Genų susiliejimas vyksta ir natūraliai gamtoje. Tai vienas iš būdų atsirasti naujiems genams, koduojantiems polifunkcinius baltymus, iš esmės hibridinius baltymus.

T_4 bakteriofago *rII* rajone rėmelio poslinkio mutacija *A* gene neturėjo jokios įtakos *B* geno veiklai, ir atvirkščiai:

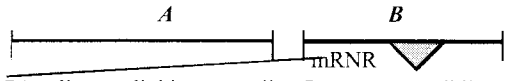


Iškritus tarpui tarp *A* ir *B* genų, šie susiliejo. Tada rėmelio poslinkio mutacija *A* gene slopino ir *B* geno veiklą. Tuo tarpu įvykus rėmelio poslinkio mutacijai *B* gene, *A* geno kodas nesutriko:

Susiliejęs *A* ir *B* genai yra veiklūs, bendras jų baltymas



Rėmelio poslinkio mutacija *A* gene, neveiklus visas susiliejęs genas



Rėmelio poslinkio mutacija *B* gene, neveikli susiliejusio geno dalis tik nuo mutantinės vietos.

Iš šių rezultatų galima spręsti, kad

kodas skaitomas tam tikra kryptimi. Genus skiria nukleotidų sekos, vadinamos **tarpikliais** (angl. *spacer*). Funkcinio vieneto (geno) koduojančiojoje dalyje kodas yra be kablelių, tarp funkcinių vienetų yra kableliai.

Skaitymo kryptis yra savita konkrečiam genui arba genų grupei (kaip *rII*). Vienų genų kodas skaitomas viena kryptimi, kitų – kita, nuo kitos DNR grandinės. Mat RNR sintezė vyksta 5′→3′ kryptimi. Genetinis kodas, kaip ir mūsų raštas, pilnas visokiausių ženklų. Pagaliau yra bendra genomo sandara – genų jungimasis į mažesnes ar didesnes grupes. Genomo sandarą, matyt, būtų galima palyginti su knygos turiniu. Yra labai stambūs skyriai, po to smulkesni, dar smulkesni...

Kableliai mRNR. Specialūs kodonai žymi polipeptido sintezės ant ribosomų pradžią ir pabaigą. Pirmiausia trys kodonai, kurie nekoduoja aminorūgščių, nėra beprasmiai.

UAA, UAG, UGA yra chromosomų DNR kodo terminacijos (pabaigos) kodonai. Jais baigiasi baltymo sintezė.

Polipeptido sintezė vyksta iki pirmo beprasmio kodono. Tačiau šie kodonai nėra visiškai universalūs (žr. toliau).

Analogiškai yra polipeptido sintezės pradžios – iniciacijos kodonai. Bet čia prasideda tai, ko gal nesitikėta: skirtingos genetinės kalbos.

Prokariotų ir eukariotų iniciacijos (pradžios) kodonai šiek tiek skiriasi:

	Met	Val	Leu	Ile			
Prokariotų	AUG	GUG	UUG	AUU			
Eukariotų	AUG		UUG		AUA	ACG	CUG
	Met		Leu		Ile	Thr	Leu

Tačiau pagrindinis prokariotų ir eukariotų iniciacijos kodonas sutampa – tai **AUG**. Visi iniciacijos kodonai yra savitos paskirties tik mRNR pradžioje, o vidinėje dalyje jie koduoja aukščiau nurodytas aminorūgštis.

Kodas yra nesanklotinis. Tai įrodyta mutacijų metodu. Jeigu kodonai būtų sanklotiniai, tai vieną nukleotidų porą pakeitus kita iš karto kiltų gilesnės pasekmės: mutantiniame baltyme pasikeistų ne viena, o dvi ar trys aminorūgštys. Tuo tarpu paprastai pakeičiama tik viena aminorūgštis. Taigi kodonai eina eilute vienas paskui kitą.

Skaitymo rėmelis. Bet kuri DNR atkarpa teoriškai galėtų būti skaitoma trejopai priklausomai nuo to, nuo kurio nukleotido pradedama skaityti. Pavyzdys:

(1) AUA AUC AUG UAU GAU AGU UUA GGU AUA AUA AGU AGC UAA

arba

(2) A UAA UCA UGU AUG AUA GUU UAG GUA UAA UAA GUA GCU AA

arba

(3) AU AAU CAU GUA UGA UAG UUU AGG UAU AAU AAG UAG CUA A

Tačiau tik pirmasis skaitymo rėmelis gali koduoti polipeptidą. Jis turi pradžios ir pabaigos kodonus, o tarp jų visi tripletai koduoja aminorūgštis.

Nukleotidų seka, koduojanti baltymą (aminorūgštis), vadinama **atviruoju skaitymo rėmeliu,** o jo ribas žymi iniciacijos ir terminacijos kodonai.

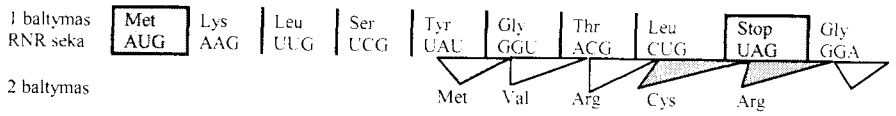
O kas atsitiktų, jeigu kodo skaitymas geno ribose pasislinktų per vieną ar du nukleotidus? Tokie poslinkiai genetiniame kode yra „už-

drausti“. Pasislinkus per vieną ar du nukleotidus, skaitymo rėmelio ribose būtinai atsirastų beprasmiai kodonai. Kaip ir įvykus rėmelio poslinkio mutacijoms (žr. aukščiau), baltymo sintezė nutrūktų.

Kaip tik taip atsitinka ir dviejuose iš trijų aukščiau pateiktų galimų skaitymo rėmelių. Tik pirmasis jų yra atvirasis, o kituose dviejuose atsiranda beprasmiai kodonai. Pastarojo tipo skaitymo rėmeliai vadinami **blokuotaisiais.**

Tačiau yra išimčių. Tokios išimtys yra **sanklotiniai genai**. Tai genai gene arba dalis vieno geno yra dalis kito geno. Juose pasislenka kodonų skaitymas nuo tos ribos, kur prasideda antrasis rėmelis.

Sanklotiniuose genuose, pasislinkus skaitymo rėmeliui, naujo skaitymo rėmelio ribose turi atsirasti jį ribojantys pradžios ir pabaigos kodonai. Žemiau pateiktame pavyzdyje yra naujas iniciacijos kodonas **AUG** ir parodyta, kaip įveikiamas beprasmis kodonas **UAG**, kuris reiškė pirmojo skaitymo rėmelio pabaigą:



Sanklotiniai genai yra tuose genomuose, kuriuose itin taupoma genetinė medžiaga, dažniausiai virusų. Dėl sanklotinių skaitymo rėmelių ta pati DNR seka gali koduoti du baltymus.

Panašiai tos pačios DNR molekulės komplementarios grandinės gali koduoti visiškai skirtingus baltymus. Kad tai įmanoma, įtikinamai įrodė Korana (žr. 2.1.2), tačiau izoliuotoje dirbtinėje sistemoje *in vitro* paprastai yra kitaip.

Ląstelėje (*in vivo*) genetinė informacija nuskaitoma tik nuo vienos DNR grandinės.

Nuo kurios – individuali geno ypatybė. Tame pačiame genome vienų genų informacija nuskaitoma nuo vienos, kitų – nuo kitos DNR grandinės. Šiai tvarkai reguliuoti irgi yra specialios nukleotidų sekos. Tačiau yra daug išimčių iš šios taisyklės, kai genetinė informacija skaitoma nuo abiejų grandinių.

Genetinio kodo universalumu įsitikinta dviem būdais. Pirma, tas pats poliribonukleotidas įvairių organizmų „neląstelinėse sistemose“ koduoja tas pačias aminorūgštis. Antra, kodo universalumas įtikinamai įrodytas tiriant mutantinius baltymus (tikrinant kodą genetiniais metodais).

Chromosomų DNR kodas, kuriuo baltyme koduojama aminorūgščių seka, yra universalus, t. y. visų organizmų vienodas.

Tačiau dabar įrodyta, kad **mitochondrijų DNR kodas yra neuniversalus**. Tai vienas sensacingiausių atradimų. 1979 m. dvi tyrinėtojų grupės, viena vadovaujama Barelo (B. G. Barell at al.), kita Makino (G. Macino et al.), išaiškino, kad **UGA** kodonas, kuris branduolio chromosomose yra stop signalas, beprasmis kodonas nekoduoja aminorūgščių, žmogaus ir mielių mitochondrijų DNR koduoja triptofaną.

2.2 lentelė. **Įvairių organizmų mitochondrijų genetinio kodo skirtumai nuo universaliojo kodo** (pagal M.D. Ter Avanesianą ir S.G. Ingę-Večtomovą, 1988)

Taksonas	Kodonas				
	UGA	AUA	CUN	AG$^{A}_{G}$	CGG
Žinduoliai	Trp	Met	Leu	Term	Arg
Augalai	Term	Ile	Leu	Arg	Trp
Drozofila	Trp	Met	Leu	Ser	Arg
Pirmuonys	Trp	Ile	Leu	Arg	Arg
Mielės (*Saccharomyces cerevisiae*)	Trp	Met	Thr	Arg	?
Neurospora crassa	Trp	Ile	Leu	Arg	?
Universalusis kodas (žr. 3.1 lentelę)	Term	Ile	Leu	Arg	Arg

Rėmeliuose pažymėti nukrypimai nuo universaliojo kodo, inicijavimo kodonai žinduolių mitochondrijose yra **AUU** ir **AUC**, o vabzdžių – **AUA** ir **AUU**.

Tačiau skirtumai tarp universaliojo (branduolio) ir neuniversaliojo (mitochondrijų) kodų, kaip matyti iš 2.1 ir 2.2 lentelės, nėra esminiai. Tie patys kodavimo principai: kodas tripletinis, išsigimęs, nesanklotinis, koduojančiojoje dalyje tarp tripletų nėra kablelių, netgi dauguma kodonų sutampa. Kodai skiriasi tik 5 kodonais, bet tarp jų yra iniciacijos ir terminacijos kodonų. Įdomu ir tai, kad šiek tiek skiriasi įvairių organizmų mitochondrijų kodai (2.2 lentelė). Tas pats tripletas įvairių organizmų mitochondrijų DNR koduoja skirtingas aminorūgštis.

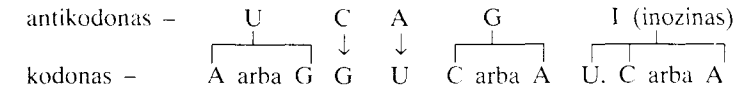
Branduolio DNR kodas irgi gali būti **nukrypęs nuo universaliojo**. Antai pirmuonių *Stylonychia, Paramecium, Tetrahymena* UAA yra ne terminacijos kodonas, o koduoja glutaminą arba glutamo rūgštį. *Tetrahymena* ir kitas universaliojo kodo beprasmis kodonas UAG koduoja glutamo rūgštį. Tad *Tetrahymena* turi tik vieną terminacijos kodoną – UGA. Tuo tarpu *Mycoplasma capricolum*, kaip ir daugelyje ištirtų mitochondrijų, branduolio DNR jis koduoja triptofaną.

Pagrindine genetinio kodo neuniversalumo priežastimi laikytinos tRNR genų mutacijos. Pastaruoju metu įrodyta, kad genetinis kodas priklauso nuo daugelio veiksnių; jis yra nevienareikšmis.

2.1.5. Genetinio kodo nevienareikšmiškumas. Genomo strategija

Nevienareikšmis atitikimas (žargoniškai – voblingas, angl. *wobble* – svirduliuoti, klibėti, virpėti). Kiekvienam kodonui teoriškai turėtų būti speciali tRNR. Tačiau ištyrus, prie kurių kodonų jungiasi atskiros tRNR, buvo nustatyta, kad nemažai tRNR atpažįsta daugiau kaip vieną kodoną. Dažniausiai tRNR skiria ir kitus tos pačios aminorūgšties kodonus, bet nebūtinai visus. Pavyzdžiui, alanino tRNR iš keturių atpažįsta tris kodonus: GCU, GCC ir GCA, bet kai kurios tRNR skiria tik vieną kodoną, pvz., *Escherichia coli* leucino tRNR tik UUG (iš 6 kodonų).

1965 m. Krikas tai paaiškino nevienareikšmiu atitikimu. Sąveikaujant tRNR antikodonui ir mRNR kodonui, tik pirmieji du nukleotidai sudaro standartines nukleotidų poras, o trečiasis nukleotidas antikodone gali sudaryti poras su daugiau kaip vienu nukleotidu:



Dėl nevienareikšmio atitikimo visus 61 aminorūgščių kodoną gali atpažinti tik 31 tRNR (mitochondrijų DNR dar didesnė ekonomija). Šį reiškinį reguliuoja ribosomų baltymai.

Konteksto (supančių nukleotidų) reikšmė šiuo metu nekelia jokių abejonių.

> Kodonų skaitymas priklauso nuo jų padėties kitų kodonų – nukleotidų, jų sekų atžvilgiu, t. y. nuo konteksto.

Galima prisiminti jau žinomą faktą – iniciacijos kodonus. Tas pats kodonas koduoja dvi skirtingas aminorūgštis. Tai priklauso nuo jo padėties. Antai AUG (Met) ir GUG (Val) ir kt. (žr. p. 102) skaitymo rėmelio pradžioje koduoja savitą aminorūgštį formilmetioniną. Šį kodoną atpažįsta specifinė tRNR.

Labai stipriai nuo konteksto priklauso beprasmiai kodonai. Gali kilti klausimas, ar tRNR mutacijos – beprasmių kodonų supresoriai nėra baisi nelaimė, mirtinos letalios mutacijos. Būtent šie supresoriai slopina *nonsens* mutacijas, pastatydami į beprasmio kodono vietą bet kurią aminorūgštį (žr. 2.2 lentelę). Tačiau lygiai tą patį jie turėtų padaryti ir su beprasmiais kodonais skaitymo rėmelio pabaigoje. Be to, terminacijos kodonai yra visose mRNR. Kiltų baisus sąmyšis, faktiškai visiškai sutriktų normali baltymų sintezė. Gelbstint vieno baltymo sintezę, sutriktų visų, ir jo paties, sintezė. Bet taip nėra.

> Terminacijos kodonai normaliai atlieka savo funkciją net esant genome tRNR supresoriui.

Pastaroji problema labai padėjo smulkiau ištirti baltymų sintezės terminavimą (žr. p. 105). Paaiškėjo, kad ne tik beprasmiai kodonai būtini baltymo sintezės pabaigai. Terminacija priklauso ir nuo gretimų nukleotidų, ir nuo kelių baltymų – terminacijos veiksnių. Vyksta beprasmių kodonų konkurencija dėl šių veiksnių, ir laimi beprasmiai kodonai, esantys skaitymo rėmelio gale.

Be to, tRNR supresorių aktyvumas yra mažas. Beprasmių kodonų slopinimas niekada nesiekia 100%, vidutiniškai – apie 45%. Mielių ir *Escherichia coli* kai kurių supresorių aktyvumas didesnis – 60–75%, bet jie slopina gyvybingumą. Taigi žalingus supresorius veikia ir šalina atranka.

Kontekstas yra ne tik viso genomo, bet ir konkrečių genų problema. Genai (ir be specialiųjų valdymo būdų, žr. toliau) yra nevienodai

veiklūs. Kontekstas (gretimų nukleotidų įtaka) – viena iš šio reiškinio priežasčių. Kai kuriuose genuose jis yra paveldima genetinio kodo neuniversalumo priežastis. Žinduolių, paukščių, augalų somatinėse diferencijuotose ląstelėse arba konkrečiuose genuose UGA beprasmis kodonas gali būti perskaitomas kaip aminorūgštį koduojantis tripletas. Antai aktyviajame pelių fermento glutationperoksidazės centre yra neįprasta aminorūgštis selenocisteinas. Jį koduoja (geno viduje!) UGA kodonas, kurio neuniversalumą šiuo atveju lemia kitų nukleotidų kontekstas.

Genomo strategija ir tRNR mutacijos bei modifikacijos. Dalinis genetinio kodo neuniversalumas ir nevienareikšmiškumas yra savotiškas gudravimas, strategija. Visos „gudrybės" sukurtos evoliucijos ir yra paveldimos.

Skiriama genomo ir geno strategija. **Genomo strategija** pasireiškia bent trimis aspektais.

1. Genetinis kodas visiems lyg ir vienodas, bet įvyko menkučiai, ypač reguliacinių iniciacijos ar terminacijos kodonų pokyčiai, ir jau skirtingi genomai nebesusikalba.

Svetimo genomo veikla sunkesnė. Tai ypač svarbu sąveikai „parazitas – šeimininkas", dažniausiai „virusas – ląstelės genomas". Pakeitus genome valdymo kodonus, galima apsisaugoti nuo parazito, arba atvirkščiai, įveikti šeimininką.

2. Genetinis kodas pritaikomas naujoms reikmėms, nekeičiant visumos. Kaip pavyzdys gali būti iniciacijos kodonai. Tie patys kodonai koduoja aminorūgštis ir yra įgiję naują iniciacijavimo funkciją.

3. Tai vienas iš būdų taupyti, kai genomo apimtis ribota. Vėl virusai, kurių genomas iš tiesų labai ribotas, ir vėl beprasmiai kodonai.

Kai kuriais atvejais ir ne nuo sanklotinių genų koduojami du baltymai. Pirmojo sintezė vyksta iki beprasmio kodono, antrojo atveju terminacijos kodonas atpažįstamas kaip koduojantis aminorūgštį. Taigi baltymo sintezė beprasmio kodono vietoje nenutrūksta, ir pasigamina ilgesnis – **ištisinio skaitymo** (angl. *read-through*) **baltymas.** Taip sintetinami įvairių virusų (Qb, f1, m13 ir kt.) kapsido baltymai. Naujasis baltymas padidina infekcines virusų galimybes. Ištisinio skaitymo baltymų aptikta *E. coli* (reguliuoja triptofano operoną), žinduolių, augalų ir kt. ląstelėse.

Geno strategija. Jos pavyzdžiu gali būti kai kurių genų veikla diferencijuotose ląstelėse. Panašiai kaip glutationperoksidazės.

Beprasmis kodonas skaitymo rėmelyje gali būti labai veiksmingas būdas genų veiklai valdyti.

Kai kurių ląstelių diferenciaciją lemia specifinis baltymas. Antai eritrocituose toks baltymas yra hemoglobinas. Triušio retikulocitų hemoglobino β-polipeptido mRNR vidinėje dalyje yra beprasmis kodonas UGA. Šiose ląstelėse UGA „įveikia" triptofano arba serino tRNR. Tuo tarpu kitokios diferenciacijos ląstelėse šio polipeptido sintezę „draudžia" beprasmis kodonas.

Fenotipinė supresija. Kodo skaitymo priklausomybė nuo įvairių veiksnių. Įprasta, kad gyvybiniai procesai priklauso ne tik nuo genotipo, bet ir nuo aplinkos veiksnių, ir atrodė neįtikėtina, kad ir genetinio kodo skaitymas priklauso nuo aplinkos veiksnių. Bet taip yra.

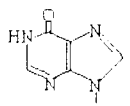
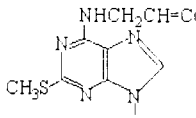
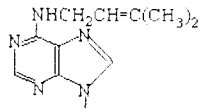
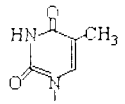
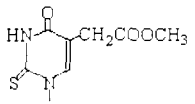
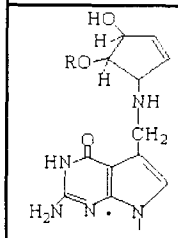
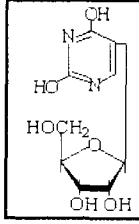
Kad genetinio kodo skaitymas priklauso nuo aplinkos, pirmieji nustatė Gorinis (L. Gorini) su bendradarbiais dar 1961 m. Jie įsitikino, kad *amber* (UAG) mutaciją viename iš *E. coli* arginino genų slopina streptomicinas. Paaiškėjo ir šio reiškinio priežastis: kodas skaitomas kaip dupletinis, tik su kableliais (trečias nukleotidas – kablelis).

Kodo skaitymą keičiančių išorinės ir vidinės aplinkos veiksnių sąrašas jau šiuo metu yra gana įspūdingas. Ir jis vis ilgės. Kodą keičia kai kurie kiti antibiotikai, purino-pirimidino analogai (pvz., fluoruracilas), senėjimas, Mg^{2+} jonų koncentracija, poliaminai, aminorūgščių badas, temperatūros pokyčiai ir kt.

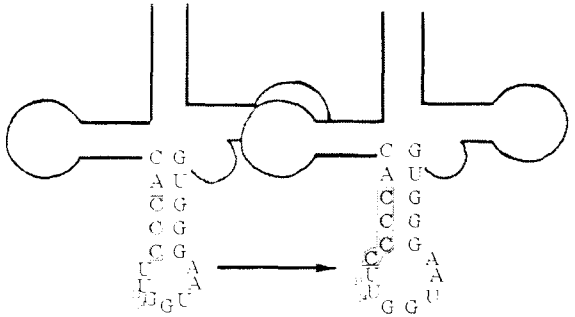
Patogiausia šiuos poveikius nustatyti pagal beprasmių kodonų įveikimą. Šie pokyčiai yra nepaveldimi, todėl pavadinti **fenotipine supresija**. Pagrindinė jos priežastis yra tRNR pokyčiai: antikodonų ir nukleotidų sekų, nuo kurių priklauso specifinis aminorūgšties prijungimas prie tRNR, modifikacija. Tačiau ji gali įvykti ir dėl kitokių priežasčių, pvz., dėl ribosomų pokyčių.

Minoriniai nukleotidai. tRNR išsiskiria iš visų RNR dideliu minorinių nukleotidų dažniu. Jie susidaro po tRNR transkripcijos, veikiant specialiems fermentams, iš įprastinių nukleotidų. Pagal šiuos fermentus koduojančių genų mutacijas pavyko nustatyti tRNR minorinių nukleotidų reikšmę. Šiek tiek pavyzdžių yra 2.5 paveiksle. Minoriniai nukleotidai keičia ne tik sąveiką „kodonas-antikodonas", bet ir tRNR sąveiką su aminoacil-tRNR-sintetaze+aminorūgštimi, tRNR sąveiką su reguliacinėmis mRNR sekomis (žr. toliau).

Dupletinis-kvadrupletinis kodas. Jau minėtas Gorinio ir jo bendradarbių atradimas apie streptomicino poveikį genetinio kodo skaitymui

	Inozinas	I	Nevienareikšmis atitikimas (voblingas)
	2-metiltio-N^6-izopenteniladenozinas	ms^2i^6A	Mažesnis aminorūgščių įjungimo tiksiumas, efektyviai slopinama *amber* (UAG) mutacija, gali kisti kai kurių bakterijų operonų (*His, Trp*) veikla
	N^6-izopentenil-adenozinas	i^6A	Keičiasi *ochre* (UAA) mutacijų supresija
	5-metiluridinas	m^5U	TψC kilpoje beveik visų elongacijoje dalyvaujančių tRNR; didesnis aminorūgščių įjungimo tikslumas
	5-(metoksikarbonil metil)-2-tiouridinas	mcm^5s^2U	Kinta eukariotų *ochre* (UAA) ir *opal* (UGA) nonsensų supresija
	Kjuzinas R=H R=β-D-manozil R=β-D-galaktozil	Q manQ galQ	Keičiasi eukariotų, bet ne prokariotų akceptorinė funkcija; eukariotų *opal* (UGA) nonsenso supresija
	Pseudouridinas	ψ	Eukariotų *opal* (UGA) nonsenso supresija

2.5 pav. **Kai kurių minorinių nukleotidų tRNR molekulėje reikšmė transliacijai**: iš kairės – bazė, pavadinimas, jo santrumpa, funkcija; formulės ir pavadinimai iš B. Juodkos „Nukleino rūgščių chemijos ir biochemijos pagrindai" (1988). Funkcija – iš M. D. Ter Avanesjano, S. G. Ingės-Večtomovo „Genetinė baltymų sintezės kontrolė" 1988 (rus.)



2.6 pav. **Kvadrupletinis antikodonas mutantinėje tRNR (*suf J*), kuri yra rėmelio poslinkio mutacijos (intarpo) supresorius:**
(pagal M. D. Ter Avanesjaną ir S. G. Ingę-Večtomovą, 1988) rėmelyje – normalaus ir kvadrupletinio antikodono seka

yra principinis. *Amber* kodonas UAG buvo perskaitytas kaip dupletinis, tik su kableliu.

Ne mažiau reikšmingas ir kitas atradimas, kad kodas gali būti kvadrupletinis. Keturių nukleotidų derinys skaitomas kaip koduojantis aminorūgštį. Pasirodo, yra genų, koduojančių tRNR, kurios slopina rėmelio poslinkio mutacijas. Primename, kad šios mutacijos atsiranda arba iškritus, arba įsiterpus nukleotidų porai. Abiem atvejais visų tripletų skaitymas pasislenka per vieną nukleotidą, ir genas yra neaktyvus. Šiuo metu jau yra žinoma daug supresorių – tRNR mutantų, kurie slopina įvairius intarpus.

Antai mRNR nukleotidų sekos GGG ribose įsiterpus dar vienam G, kodas sutrinka. Tačiau šią skaitymo rėmelio mutaciją slopina Gly tRNR, kurios antikodone yra keturi CCCC. Analogiškai mRNR kodoną AAAA slopina Lys tRNR su antikodonu UUUU, mRNR kodonus GGGG ACCA, ACCU, ACCC slopina Thr tRNR su antikodonu UGGU (dėl nevienareikšmio atitikimo), mRNR kodoną CCCC slopina Pro tRNR su antikodonu GGGG.

Slopinamos ir iškritos. Tada antikodonas yra dupletinis.

Skaitymo rėmelio supresorių – tRNR genų antikodone (arba visiškai šalia jo) irgi yra atitinkamai įsiterpusi arba iškritusi nukleotidų pora (2.6 pav.).

Jau žinoma atvejų, kai ir normaliose, nemutantinėse mRNR yra kvadrupletinių kodonų. Antai gerokai veiksmingesni mielių terminavimo kodonai yra kvadrupletiniai – ne **UAG**, o UAG_G^A.

Dėl sąveikos „mRNR kodonas–tRNR antikodonas“ pokyčių kodas skirtingose įvairių organizmų ląstelėse ir net genuose yra nevienareikšmis ir priklauso nuo genetinių ir aplinkos veiksnių. Mutacijos ir aplinkos veiksniai gali pakeisti genetinio kodo sandarą: tripletinis → dupletinis arba kvadrupletinis.
Pagrindiniai veiksniai, lemiantys genetinio kodo nevienareikšmiškumą, yra tRNR.

2.2. Genas

2.2.1. Genų simboliai

Genų ženklai (simboliai). Tvarką žymėti genus simboliais – raidėmis pirmasis įvedė Mendelis. Jis dominuojančiuosius genus (požymius) žymėjo didžiosiomis, recesyviuosius genus – mažosiomis raidėmis, alelinius genus – ta pačia raide, nealelinius genus – skirtingomis raidėmis (tarkim, *A* ir *a*, *B* ir *b*). Morganas šią žymėjimo tvarką patobulino. Kaip minėta, drozofilos genus jis pavadino angliškais mutacijų pavadinimais ir jų 1–3, o kartais ir keturių raidžių santrumpomis. Antai mutacija baltos drozofilos akys užrašoma *white* – *w*. Šitaip žymimas recesyvusis alelis. Tačiau dominuojantis drozofilos alelis (tamsiai raudonos akys) gali būti žymimas dvejopai – *W* arba w^+. Geno žymėjimas „+“ (plius) reiškia ne tiek geno dominavimą, kiek **normalų**, arba dar kitaip vadinamą **laukinį, tipą**, t. y. simbolizuoja geną, būdingą normalioms konkretaus organizmo formoms. Dažnai abi šios geno savybės sutampa, bet ne visada. Antai drozofilos akių formos (sumažėjęs fasečių skaičius) mutacija *Bar* (simbolis *B)* yra dominuojanti, o normalusis alelis, žymimas B^+, yra recesyvusis.
Savitai žymimi polialeliniai genai. Dažniausiai to paties lokuso genai žymimi tuo pačiu simboliu tik su „priedais“ (w, w^e, w^i, w^a, arba I^A, I^B). Tai bendri genų žymėjimo principai. Konkrečių taksonų ir požymių genetikoje yra sava genų žymėjimo tvarka. Šią tvarką nustato tarptautiniai atitinkamos srities arba taksono genetikos centrai ir yra visiems privaloma. Dėl šios priežasties periodiškai spausdinami konkrečių organizmų genų sąrašai. Šį darbą atlieka centrai.

Mikroorganizmų genetikoje genai dažniausiai žymimi pagal tai, ką jie koduoja (baltymą, RNR, metabolitą, procesą). Prie geno simbolio viršuje rašomas „+“, kai genas veiklus (normalus), ir „–“, kai

genas neveiklus (*nul*-mutacija). Šį žymėjimą paįvairina specifiniai geno pokyčiai – tarpinės (*leaky*), temperatūrinės (*ts*) mutacijos. Genai gali būti žymimi iš eilės raidėmis (*dnaA, dnaB, dnaC*) arba skaičiais (*cdc2, cdc18, cdc27*). Eilė sudaroma arba pagal genų atradimą, arba pagal koduojamų įvykių eigą. Pradedant didžiąja raide užrašomi ne dominuojantys aleliai, o genų produktai. Pvz., geno *dnaA* produktas yra baltymas DnaA, atitinkamai, *cdc2* ir Cdc2. Kai reikia skirti normalų alelį nuo mutantinio, rašomas „+“, pvz., $dnaA^+$. Šią tvarką pastaruoju metu perima ir genetikai, tiriantys kitus organizmus.

Mielių *Saccharomyces* genai ir nukleotidų sekos žymimi didžiosiomis raidėmis – *CDC 2, CEN-A, CEN-B* ir pan.

Žmogaus genai dažniausiai žymimi arba pagal požymius, savybes, kurias jie lemia, arba pagal paveldimų ligų pavadinimus. Kaip žinome, ligų pavadinimai yra lotyniški, tad ir genų simboliai dažnai yra kilę ne iš anglų, bet iš lotynų kalbos žodžių. Jie rašomi didžiosiomis raidėmis, pvz., *HOX*. Tie patys pelės genai užrašomi *Hox*.

2.2.2. Funkcinis geno dalomumas ir alelizmas

Morganas buvo tvirtai įsitikinęs, kad genas yra nedalomas ir yra pats mažiausias paveldimumo vienetas. Kurį laiką tai buvo viena iš genetikos dogmų. Pasak jos, mažesnių už geną funkcinių paveldimumo vienetų negali būti. Manyta, kad genas taip pat yra mažiausias mutacijos ir rekombinacijos vienetas.

Geno centrų teorija. Kad genas yra dalijamas funkcijos atžvilgiu ir kad mutacijos gali įvykti įvairiose geno vietose, 1930 m. pirmasis įrodė rusų genetikas A. Serebrovskis. Tiriant drozofilos *sc-ac* (*scute-achaete*, angl. *scute* – šarvai, *achaete* – be šerelių) geną, nuo kurio priklauso šerelių vystymasis kūno paviršiuje, paaiškėjo, kad šis genas sudarytas iš daugelio subvienetų, aktyviųjų centrų, kuriuos Serebrovskis pavadino transgenais. Visas genas buvo vadinamas bazigenu, o geno teorija, pagal kurią genas sudarytas iš aktyvių centrų – geno centrų teorija.

Šio geno mutantiniai aleliai lemia šerelių redukciją įvairiose kūno dalyse. Sukryžminus homozigotinius mutantus, heterozigotiniams organizmams šereliai neaugdavo tik tose vietose, kuriose abiejų mutantų sutapo. Pavyzdžiui, jeigu dėl vienos mutacijos sc_1 šereliai nesivystė

ABC, o dėl kitos sc_2 – BCD, tai drozofilos buvo plikos tik BC kūno paviršiaus vietose. Neabejotinai kiekviena šerelių vieta buvo funkciškai ir genetiškai savarankiška. Vyko ne viso geno, o tik atskirų centrų mutacijos.

Krosingoverį geno viduje – tarp to paties geno atskirų dalių išaiškino Liujisas (E. B. Lewis), Grinas (M. Green) ir Oliveris (C. P. Oliver). Tai buvo įrodyta komplementacijos testu. Jis yra vienas iš prieinamiausių ir paprasčiausių būdų nustatyti, ar mutacijos yra to paties geno – alelinės, ar skirtingų – nealelinių genų. Primename, kad to paties geno struktūrinės atmainos yra aleliniai genai, arba aleliai, o skirtingi, nors ir lemiantys tą patį požymį genai yra nealeliniai.

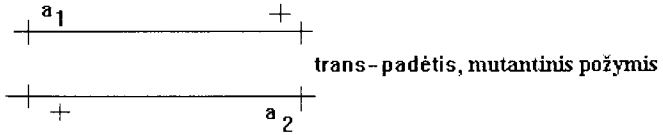
Organizmo genetinių galimybių visuma vadinama **genotipu** (gr. *genos* – giminė, kilmė+*typos* – atspaudas, pavyzdys). Ši sąvoka taikoma ir konkretiems genams.

Atitinkamai

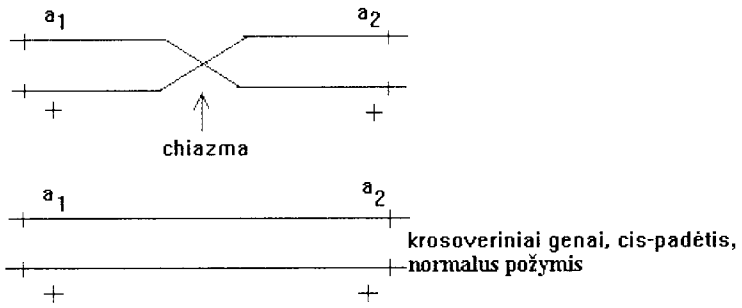
organizmo požymių visuma vadinama **fenotipu** (gr. *phaino* – parodau+tipas). Ši sąvoka taikoma ir konkrečiam požymiui.

Antai fenotipą nusakome šitaip: normalus požymis – mutantinis požymis, šeriuotas – plikas drozofilos kūnas ar jo dalys ir pan. Bet kuri vieta gene (nukleotidų sekos, pažaidos) vadinama **saitu**, skirtingai nuo geno vietos – **lokuso**.

Kai mutacijos yra to paties geno, pirmosios kartos hibridai (F_1) yra mutantinio fenotipo, t.y. nenormalaus požymio.



Čia a_1 ir a_2 – pažeisti saitai (geno dalys), pliusas – normali to paties geno dalis. Aukščiau pavaizduotų pažaidų padėtis viena kitos atžvilgiu vadinama **trans-padėtimi**. Esant pažaidoms tame pačiame gene trans-padėtyje, fenotipas yra mutantinis, nes abu aleliai pažeisti. Tačiau retkarčiais hibridai tarp mutantų, kurie pažeisti tame pačiame gene, yra normalaus fenotipo. Taip atsitinka, kai tarp geno dalių įvyksta krosingoveris, apsikeičiama geno dalimis:



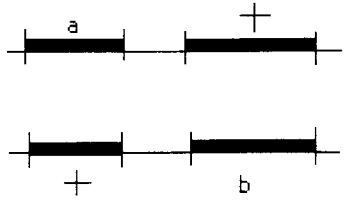
Ši geno dalių padėtis viena kitos atžvilgiu vadinama **cis-padėtimi.** Taigi kai abu (arba visi) pažeisti saitai yra tame pačiame gene cis-padėtyje, išsivysto normalus fenotipas.

Šis reiškinys aiškinamas taip: cis-padėtyje abi pažaidos yra viename gene, o kitoje chromosomoje genas yra visiškai normalus (funkcionalus), ir jis pasireiškia fenotipe, dominuoja prieš alelį su dviem pažaidomis.

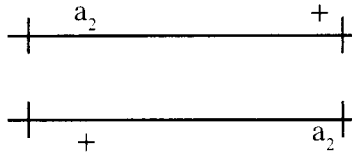
Pagal trans-padėtį nustatoma, kada du tokio paties fenotipo mutantai priklauso tam pačiam genui, o kada yra skirtingų, nealelinių genų pokyčiai. Šis **trans-testas** dar vadinamas **komplementacijos testu**. Jį pirmą kartą panaudojo 1938 m. Morganas, Bridžesas ir Startevantas. Tai vienas iš būdų alelizmui nustatyti.

Trans-padėtį gauti nesudėtinga: reikia sukryžminti du mutantus, ir jų F_1 hibridai atitinka šią padėtį.
Kai dvi mutacijos yra skirtinguose genuose, trans-padėtyje būna normalus fenotipas, o kai dvi mutacijos yra tame pačiame gene, – mutantinis fenotipas.

Tarkime, kad dvi mutacijos yra skirtinguose lokusuose, bet abu genai toje pačioje chromosomoje:



Tada mutantinį geną *a* stelbia antrojoje homologinėje chromosomoje esantis normalus (+) genas, o mutantinį geną *b*, esantį antrojoje homologinėje chromosomoje, stelbia normalus (+) genas pirmojoje homologinėje chromosomoje, todėl abu mutantinius genus nustelbia normalūs aleliai, ir fenotipas yra normalus. Kai mutacijos yra skirtinguose to paties geno saituose, kaip minėta, abu genai ir pirmojoje, ir antrojoje homologinėje chromosomoje būna pažeisti, o fenotipas trans-padėtyje yra mutantinis, nes abu aleliai pažeisti, todėl negali normaliai veikti:



Alelizmo įrodymai. Ar genai yra aleliniai, sprendžiama iš požymio (fenotipo): aleliniai genai lemia to paties požymio skirtingas, alternatyvias išraiškas. Bet tai labai nepatikimas rodiklis. Dažnai du genai, lemiantys to paties požymio variantus, yra nealeliniai. Pavyzdžiui, sukryžminus vaisines museles (*Drosophila melanogaster*) rudomis ir šviesiai raudonomis akimis, visos F_1 muselės yra tamsiai raudonomis akimis, o F_2 pasiskirsto taip: 9/16 tamsiai raudonomis: 3/16 rudomis: 3/16 šviesiai raudonomis: 1/16 baltomis akimis, t. y. 9:3:3:1.

Tai dihibridinio kryžminimo santykis (žr. p. 584). Iš to galima daryti išvadą, kad rudą ir šviesiai raudoną akių spalvą nulemia skirtingi, nealeliniai genai. Taigi antrasis alelizmo įrodymas yra hibridologinė analizė. Kai genai yra aleliniai, sukryžminus tiriamąsias formas, F_2 gaunama santykiu 3:1. Tuo tarpu kai F_2 yra santykis, atitinkantis dihibridinį (bendra suma 16, pvz., 9+3+3+1 arba 9+7, arba 15+1, arba 9+3+4 ir kt.) arba sudėtingesnį kryžminimą, požymių skirtumą neabejotinai lemia nealeliniai genai.

Tačiau net hibridologinė analizė negali įrodyti alelizmo, nors genetikoje dažnai tik ja ir remiamasi. Esant genų sankibai (žr. p. 591), t. y. kai genai toje pačioje chromosomoje, monohibridinio kryžminimo santykis F_2 gali būti ir tuo atveju, kai skirtumus tarp tėvų nulemia nealeliniai genai. Todėl patikimiausias ir svarbiausias alelizmo kriterijus – geno vieta chromosomoje. Aleliai homologinėse chromosomose užima tą pačią vietą – lokusą.

Komplementacijos testas labai palengvina alelizmo nustatymą. Kaip minėta, sukryžminus drozofilas rudomis ir šviesiai raudonomis

akimis, F_1 hibridai esti normaliomis tamsiai raudonomis akimis. Vadinasi, jau iš F_1 galima spręsti, kad rudą ir šviesiai raudoną akių spalvą lemiantys genai yra nealeliniai, arba mutacijos yra skirtinguose genuose. Tas pat gaunama kartais sukryžminus du visiškai tokios pačios spalvos, būtent šviesiai raudonomis akimis drozofilos mutantus, pavyzdžiui, mutantus ***v*** (***vermilion,*** angl. cinoberis – ryškiai raudona spalva) ir ***cn*** (***cinnabar,*** angl. cinoberis). Jų F_1 yra normaliomis tamsiai raudonomis akimis, taigi mutacijos yra nealelinės, priklauso skirtingiems lokusams. Tik kai mutantai šviesiai raudonomis akimis yra to paties geno (pvz., *cn*), F_1 fenotipas yra mutantinis – šviesiai raudonomis akimis.

Komplementacijos testas, arba kitaip trans-testas labai veiksmingas, kai norima išaiškinti, keli genai nulemia požymį. Reikia gauti daug tokio paties fenotipo atskirų mutantų. Panagrinėkime, kaip gaunami miežių mutantai *eceriferum* (augalai be vaško apnašos). Paveikus miežių sėklas mutagenu, kiekvieno augalo palikuonys sudaro šeimą. Joje gali pasitaikyti ne vienas, o keli augalai be vaško apnašos, tačiau jie tikriausiai bus kilę iš vienos pakitusios ląstelės, t. y. yra tapatūs. Atskirais mutantais jų laikyti negalima. Tačiau iš dviejų skirtingų šeimų tokio paties tipo *eceriferum* mutantai yra nevienodi, nes tas pats fenotipas išsivystė po mutacijos arba tame pačiame gene, tik skirtinguose saituose (tiksliai to paties saito mutacijos tikimybė yra labai maža), arba skirtinguose genuose.

Visi šie mutantai išbandomi trans-testu (sukryžminami tarpusavyje) ir sugrupuojami. Grupės viduje yra tie mutantai, kurių F_1 hibridai yra mutantinio fenotipo. Jie yra skirtingų to paties geno saitų mutacijos ir gali būti panaudoti smulkiai šio geno analizei. Mutantai, kurių F_1 hibridai yra normalaus fenotipo, priklauso skirtingoms grupėms, taigi ir skirtingiems genams. Kiek yra grupių, tiek ir genų, nulemiančių požymį.

Švedų mokslininkė Lundkvist (U. Lundkvist) ištyrė 1347 miežių *eceriferum* mutantus. Visi jie buvo sukryžminti tarpusavyje ir suskirstyti net į 66 grupes. Vadinasi, miežių lapus ir stiebą dengiančio vaško sintezę nulemia ne mažiau kaip 66 genai (gali būti ir kiti kol kas neaptikti lokusai).

Aleliai yra to paties geno struktūrinės atmainos, nulemiančios skirtingas to paties požymio išraiškas. Apie alelizmą sprendžiama iš:

- **fenotipo** – aleliniai genai lemia tą patį požymį;
- **hibridologinės analizės** – kai genai aleliniai, F_2 hibridų santykis 3:1, visais kitais atvejais (kai 9:3:3:1 ir pan.) tikrai genai yra nealeliniai;
- **geno vietos** – nustatytos įvairiais būdais;
- **komplementacijos tyrimų** – alelinių genų F_1 yra mutantinio, o nealelinių – normalaus fenotipo.

Polialelizmas. Alternatyvi požymio išraiška, lemiama alelio, atsiranda dėl mutacijų. Pasitaiko, kad požymis turi tik dvi alternatyvias išraiškas arba iš viso požymio variantai nežinomi, tačiau gali būti ir atvirkščiai: irgi dėl mutacijų tas pats genas yra įgijęs keletą struktūrinių atmainų. Toks reiškinys vadinamas **polialelizmu**. Štai tik dalis drozofilos polialelių, nulemiančių įvairius akių atspalvius: normalios tamsiai raudonos akys (*White*, *W* arba w^+) – vyninės (*wine*, w^{wn}) – kraujo spalvos (*blood*, w^{bl}) – koralų spalvos (*coral*, w^{co}) – vyšninės (*cherry*, w^{ch}) – eozininės (*eosin*, w^e) – abrikosinės (*apricot*, w^a) – buivolo odos spalvos (*buff*, w^{bf}) – dramblio kaulo (*ivory*, w^i) – medaus spalvos (*honey*, w^h) – perlų spalvos (*pearl*, w^p) – baltos spalvos (*white*, *w*). Vienos pelės kailiuko spalvos genų yra 6 polialeliai: vienos spalvos pilkos (aguti) – pilkos su įvairiais margumo tipais – geltonos – juodos su gelsvu pilveliu – juodos su gelsvais plaukeliais ant ausų – visiškai juodos. Dvylikos polialelių serija nulemia įvairiai sumažėjusius drozofilos sparnus.

Visi šie genai vienas kito atžvilgiu yra aleliniai, t. y. F_2 skilimo santykis 3:1, ir visi jie yra įvairios to paties chromosomos lokuso atmainos. Tačiau vienu metu atskiras individas genotipe (heterozigotinėje būklėje) gali turėti ne daugiau kaip du tokius genus, pavyzdžiui, ***Ww***, $w^e w$, $w^e w^a$ ir t. t., nes aukštesniųjų eukariotų branduolyje yra po dvi homologines chromosomas (žr. p. 564).

To paties geno struktūrinių atmainų – alelių skaičius yra viena iš geno ypatybių, geno evoliucijos rezultatas. Jis priklauso nuo to, ar reikalinga geno produktų įvairovė, ar būtinas labai didelis vienodumas.

Kraujo grupių ABO sistema – vienas geriausių alelinių genų subalansuotos sistemos pavyzdžių. Yra trys pagrindiniai aleliniai genai.

Formaliai genai I^A ir I^B lemia atitinkamų antigenų A arba B sintezę; *i* – nei vieno, nei antro nelemia ir yra recesyvusis. Taigi žmogus, kurio kraujo grupė O, yra homozigotinis *ii*. ABO lokusas koduoja galaktoziltransferazę, kuri prijungia skirtingus cukrus prie bazinio antigeno O:

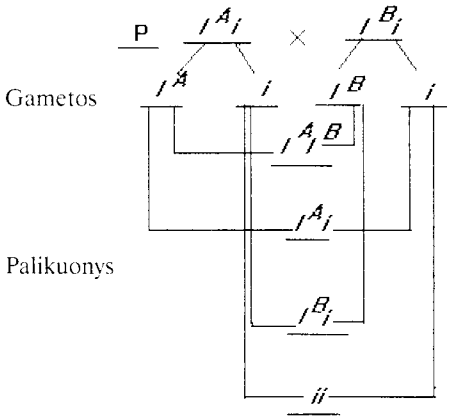
Genas	Koduoja	Substratas	Antigenas
I^A	N-acetilgalaktoziltransferazę	UDP acetilgalaktozė	A
I^B	galaktoziltransferazę	UDP galaktozė	B
ii	(–) *nul*-mutacija	–	(bazinis O)

Vienas fermentas nuo kito skiriasi 4 aminorūgštimis. Bazinį O antigeną turi visi individai (ir ***ii*** genotipo). A ir B antigenai skiriasi prie O papildomai prijungtais cukrais.

Žmogus, kurio kraujo grupė yra A, gali būti arba I^AI^A genotipo, arba I^Ai genotipo. Atitinkamai B kraujo grupės žmogus gali būti homozigotinis I^BI^B arba heterozigotinis I^Bi. Normalu, kad, susituokus dviem asmenims, kurių kraujo grupė A, vaikai gali gimti ne tik A, bet ir O kraujo grupės, kai abu tėvai yra heterozigotiniai – $I^Ai \times I^Ai$. Panašiai yra ir susituokus dviem asmenims, kurių kraujo grupė B. Asmenys, turintys kraujo AB grupę, kaip ir O grupės, yra aiškaus I^AI^B genotipo. Jie yra heterozigotiniai, bet ypatingo tipo: abu genai vienas kito nestelbia, ir kiekvienas nulemia atitinkamas transferazes. Tokia sąveika vadinama **kodominavimu.**

Kai motinos kraujo grupė A, o tėvo B arba atvirkščiai, gali būti labai įvairi situacija:

- abu tėvai homozigotiniai $I^AI^A \times I^BI^B$, vaikai I^AI^B genotipo ir yra AB kraujo grupės;
- vienas iš tėvų homozigotinis, antras – heterozigotinis, pvz., $I^AI^A \times I^Bi$ arba $I^Ai \times I^BI^B$, pusė vaikų AB (I^AI^B), o kita pusė arba A (I^Ai), arba B (I^Bi) kraujo grupių;
- abu tėvai heterozigotiniai:



Tokioje šeimoje vienoda tikimybė (1:1:1:1) gimti bet kurios kraujo grupės vaikui. Šis skilimo santykis yra dėl kodominavimo.

Antigenų sintezė yra tiksliai suderinta. Mat ABO kraujo grupių sistema, palyginti su kitomis žmogaus kraujo grupių sistemomis, yra ypatinga: iš anksto genetiškai užprogramuoti ir kraujo serume gaminasi atitinkami antikūnai α ir β. Vadinasi, be jokios pirminės sąveikos eritrocituose sintetinami antigenai, o kraujo serume – antikūnai. Bet jie suderinti:

A kraujo grupės eritrocituose yra A antigenas, kraujo serume – β antikūnas;
B kraujo grupės eritrocituose – B antigenas, kraujo serume – α antikūnas;
AB kraujo grupės eritrocituose – A ir B antigenai, serume antikūnų nėra;
O kraujo grupės eritrocituose antigenų nėra, serume yra α ir β antikūnai.

Kraują perpilant svarbu, kad nesutaptų A antigenas ir α antikūnas, arba B antigenas ir β antikūnas. Sutapus sulimpa (agliutinuoja) eritrocitai.

Izoaleliai. Kartais normalūs ir mutantiniai aleliniai genai labai mažai skiriasi. Tokios normaliam genui artimos jo atmainos vadinamos **izoaleliais** (gr. *isos* – lygus). Norint juos aptikti, reikia atlikti specialius tyrimus: išbandyti neįprastoje genetinėje (tam tikros rūšies heterozigotos, genai modifikatoriai) arba išorinėje aplinkoje. Pavyzdžiui, genas *White* (tamsiai raudonos akys) įvairiose populiacijose skiriasi mutacijų dažniu. Šį skirtumą lemia izoaleliai. Jie itin svarbūs organizmams prisitaikant prie kintančių aplinkos sąlygų. Žinomi ir žmogaus normalių genų izoaleliai: normalių raumenų (alternatyva – raumenų distrofija), **ABO** (2.3 lentelė) ir kt.

Antai, kaip minėta, I^A ir I^B genų produktai yra atitinkamai **A** ir **B** antigenai. I^A ir I^B turi izoalelius. Jų koduojami antigenai imunologiškai nesiskiria, bet bendras genų skaičius šiame lokuse ne 3, kaip minėta, o 12. Kai kuriais atvejais tai svarbu ir perpilant kraują. Be to, perpilant kraują svarbios ir kitos kraujo grupės: **Rh+(rezus), Lewis ir kt.**, kurių pas žmogų jau surasta mažiausiai 29.

Kai kurios iš jų labiau paplitusios, irgi nurodytos 2.3 lentelėje. Taigi geriausia perpilti savo paties kraują. Šia kryptimi ir tobulinama kraujo perpylimo strategija – turėti asmens kraujo bankus.

2.2.3. Tarpalelinė komplementacija ir polifunkciniai baltymai

Polifunkcinių genų sandaros klausimas gali būti labai komplikuotas tais atvejais, kai reikia atskirti, ar yra vienas funkciškai dalijamas genas, ar yra artimai sukibę genai. Pastaroji situacija būna tada, kai

2.3 lentelė. **Labiausiai paplitusios žmogaus kraujo grupės**
(remiantis V. Efroimsonu, 1968, ir G. Petrani, 1982)

Kraujo sistema	Globaliai arba plačiai paplitę aleliai*	Apytikris bendras žinomų alelių skaičius
ABO	***O, A_1, A_2, B***	12
Rezus**	***Cde/cde, cde/cde, CDE/cde, CDe/cDE, CDe/CDe***	36
MNSs	***M, N, S, s***	6
P	***P_1, P_2, p***	4
Kell*	***K, k***	8
Lewis**	***Le, le***	2
Lutheran	***Lu^a, Lu^b***	3
Duffy**	***Fy^a, Fy^b, Fy^c***	7
Kidd	***Jk^a, Jk^b***	3
Diego	***Di^a, Di^b***	2
Sutter	***Js^a, Js^b***	2
Xga	***Xg^a, Xg^b***	2
Sekrecija	***Se, se***	2

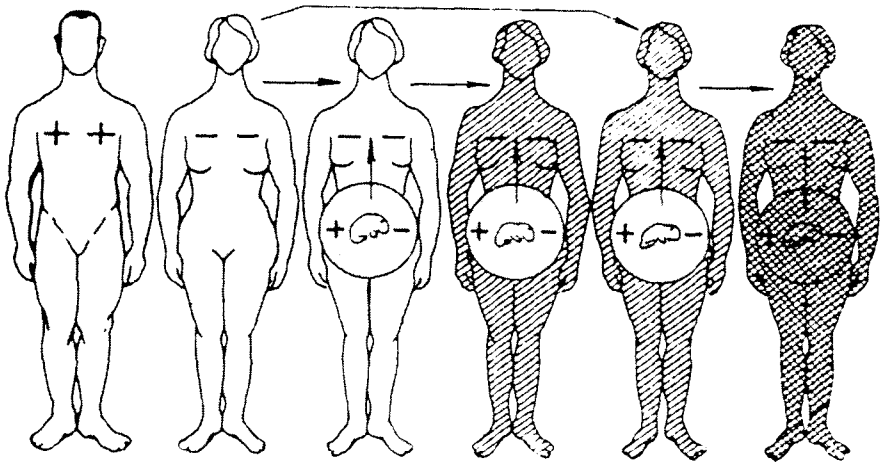
* – aleliai, aptikti 100 milijonų ir daugiau žmonių; ** – duomenys patikslinti remiantis G. Petrani (1982).

chromosomoje greta yra du arba daugiau artimus ar netgi tapačius požymius lemiančių genų. Tokia situacija, pvz., būdinga kartotinių genų (žr. p. 131) sankaupoms. Koks sudėtingas klausimas, labai gerai rodo rezus (Rh+) kraujo grupių genetiniai tyrimai.

Rezus kraujo grupių sistema formaliai diagnozuojama kaip Rh+ (yra antigenas) ir Rh– (nėra antigeno). Ji svarbi ne tik perpilant kraują, bet dar svarbesnė vaisiaus įgimtos geltos (eritroblastozės) profilaktikai ir gydymui. Dauguma žmonių turi Rh+ grupę, o visi kiti 15% – Rh– grupę. Rh^+ genas yra dominuojantis, Rh^- recesyvusis. Taigi paveldėjimas yra pats paprasčiausias, pagal klasikinius Mendelio dėsnius.

Kritiška padėtis būna tose šeimose (2.7 pav.), kuriose motina yra Rh– grupės, o tėvas Rh+ grupės (būtina nurodyti, kad fenotipai žymimi Rh+ arba Rh–, genai Rh^+ arba Rh^-). Pirmiausia išnagrinėkime paprastesnę situaciją, kai tėvas, kurio kraujo grupė Rh+, yra homozigotinis Rh^+Rh^+, o motina su recesyviuoju požymiu (Rh– kraujo grupės). Suprantama, ji yra homozigotinė. Tada

6. 1313



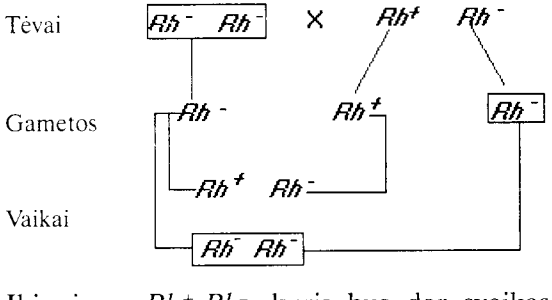
2.7 pav. **Rezus veiksnio paveldėjimas ir eritroblastozės išsivystymas:** *a* – tėvas *Rh*+ geno donoras; *b* – motina, kurios kraujo grupė Rh–; *c* – pirmasis nėštumas, nors motinos kraujyje pasigaminę antikūnai, vaikas normalus; *d* – antrasis nėštumas – antikūnams iš motinos kraujo patekus į gemalo kraują ir reagavus su gemalo eritrocitais, išsivysčiusi eritroblastozė

	(Rh–)		(Rh+)
Tėvai	Rh^-Rh^-	×	Rh^+Rh^+
Gametos	Rh^-		Rh^+
Vaikai		Rh^+Rh^-	
		(Rh+)	

Visi vaikai šioje šeimoje bus heterozigotiniai, bet kadangi genas Rh^+ yra dominuojantis, tai vaisiuje gaminsis **rezus antigenas**.

Paprastai toks neatitikimas nekelia problemų, nes motinos gimdoje besivystantis gemalas atskirtas placenta. Tik kai pažeidžiama placenta (tik 1/20 šeimų, kuriose yra rezus neatitikimas), prasideda **eritroblastozė**. Ir tai ne pirmą kartą gimdant, kai gemalo antigenai patenka į motinos kraują ir serume gaminasi antikūnai, o esant antram ir trečiam nėštumui, kai prasideda gemalo eritrocitų hemolizė (eritrocitų irimas išsiskiriant iš jų hemoglobinui). Įgimta gelta gali pasireikšti ir pirmą kartą gimdant, jeigu prieš tai buvo savaiminis ar dirbtinis abortas arba prieš nėštumą motinai buvo perpiltas kraujas su rezus veiksniu. Laiku išaiškinus antikūnų susidarymą, galima imtis priemonių gemalui išsaugoti.

Šeimos, kuriose tėvų Rh neatitinka, gali būti ir daugiavaikės, jeigu normaliai veikia placenta arba tėvas yra heterozigotinis, bet atsitiktinai motinos kiaušialąstės bus apvaisinamos tėvo spermatozoidais su Rh^- genu, ir gims vaikai Rh– kraujo grupės:



Iki pirmo Rh^+ Rh^-, kuris bus dar sveikas, bet motinos kraujyje gaminsis antikūnai, ir kitas gimdymas bus nesėkmingas. Taigi Rh kraujo grupių sistema skiriasi nuo ABO tuo, kad kraujo serume iš anksto antikūnų nebūna. Jie susidaro tik patekus antigenams.

Rezus kraujo grupių sistemą irgi lemia polialeliai (žr. 2.4 lentelę). Jų net daugiau negu ABO kraujo grupių sistemos – 36. Tačiau Rh antigeną lemia sudėtingas vienetas, sudarytas iš trijų dalių *CDE*. Iki šiol svarstoma, ar tai vienas genas, ar operono tipo (žr. p. 271) genų sankaupa. *CDE* lokusas turi bendrą valdymo seką. Tarp *CDE*/*cde* alelių vyksta krosingoveris, *C(c)*, *D(d)* ir *E(e)* heterozigotose yra funkciškai savarankiški.

Bakteriofago T_4 *rII* rajono smulkią genetinę analizę atliko Benzeris. Jo naudota genetinė *Escherichia coli* kamienų sistema *rII* mutantams, komplementacijai, rekombinacijai tirti buvo jau aptarta (žr. p. 49). Benzerio nuopelnas tas, kad jis sukūrė virusų genų analizės metodus: sanklotinių delecijų metodą, metodus delecijos vietai ir riboms nustatyti, delecijos ir krosingoverio dydį nukleotidų poromis, pritaikė krosingoverį ir komplementaciją virusų genetinei analizei. Nustatė, kad geno viduje krosingoveris vyksta įvairaus dydžio nukleotidų sekomis ir kad homologinės DNR molekulės gali keistis net viena nukleotidų pora.

Nors genetinė sistema buvo labai jautri, leidžianti aptikti rekombinantus, kurių atsiradimų dažnis lygus 0,00001%, tačiau nė karto nepavyko gauti mažesnio kaip 0,01% rekombinantų dažnio. Paslaptis paaiškėjo, kai buvo apskaičiuota, kam lygi viena nukleotidų pora krosingoverio vienetais. Visa viruso T_4 DNR sudaro 1500%, o nukleotidų porų šioje DNR yra 150000. Taigi viena nukleotidų pora rekombinacijos

vienetais lygi 1500%: 150000 = 0,01%. Suprantama, kad mažesniu kaip viena nukleotidų pora DNR segmentu apsikeisti dvi DNR molekulės negali, todėl ir rekombinacijos dažnis negali būti mažesnis kaip 0,01%. Tai patvirtino ir minėtų bandymų duomenys.

Suradus rekombinacijos tarp dviejų saitų dažnį, sužinoma, kam lygus atstumas tarp jų, išreikštas nukleotidų poromis, arba kokio dydžio DNR segmentu buvo apsikeista tarp dviejų virusų.

Tačiau Benzerio nustatyti funkcijos, rekombinacijos, mutacijos vienetai (atitinkamai cistronas, rekonas, mutonas) šiuo metu yra tik istoriniai, netekę reikšmės terminai. Išliko tik policistrono sąvoka, vartojama tada, kai nuo genų grupės transkribuojamas vienas bendras transkriptas.

Tarpalelinė komplementacija. Nustatytas gana netikėtas reiškinys. Komplementacija gali būti ne tik tarp nealelinių genų, bet ir tarp to paties geno dalių.

> **Tarpalelinė** (geno viduje) **komplementacija** vyksta tarp genų produktų – polipeptidai gali sąveikauti tarpusavyje, sudarydami hibridines baltymo molekules.

Šį reiškinį 1959 m. pirmasis aptiko Vudvardas (D. Woodward). Sujungus ekstraktus iš dviejų mutantinių *Neurospora* grybo linijų, nesugebančių sintetinti adenilsukcinazės, gautas aktyvusis baltymas. Fermentinis aktyvumas atsistato. Tiesa, jis niekuomet neprilygo fermentų aktyvumui, kuris yra normalaus *Neurospora* grybo. Vėliau, 1965 m., Finčemas (J. R. S. Finchem) ir Kadingtonas (A. Coddington), panaudoję radioaktyviąją žymę, įrodė, kad, sumaišius apvalytus mutantinius glutamatdehidrogenazės baltymus (neturinčius fermentinio aktyvumo), atsistato fermentinis aktyvumas, susijungus skirtingiems fermento subvienetams: arba atsistato fermentas iš atskirų fragmentų, arba vyksta kooperacija tarp baltymo funkcinių centrų, arba ištaisomos konformacinės (erdvinės) baltymo pažaidos. Tarp domenų esantį ryšį lengvai atakuoja proteolitiniai fermentai, ir, jam nutrūkus, domenas vėl labai lengvai susijungia. Tačiau mutantiniai baltymo subvienetai sunkiai jungiasi – jie neatitinka vienas kito. Normalūs subvienetai, atvirkščiai, lengvai komponuojasi vienas su kitu. Ši savybė priklauso nuo konformacinių baltymo ypatybių.

Ne tarp visų alelinių genų pastebima tarpalelinė komplementacija. Pagal tai genai skirstomi į **heteroalelius**, tarp kurių gali būti rekombinacija geno viduje ir tarpalelinė komplementacija, ir **homoalelius**, kuriems šie reiškiniai nebūdingi.

Visiškai įmanoma, ir tai įrodoma bandymais, kad, susidarius hibridinei baltymo molekulei, baltymas gali įgyti naujų savybių. Antai sukryžminus *Pearleneck* linijos balandžius su keršuliais, hibridai sintetina visus antigenus, kurie aptinkami tėvų organizmuose, bet atsiranda ir naujų.

Dėl tarpalelinės komplementacijos kilo du svarbūs klausimai:

- ar apskritai priimtinas komplementacijos testas genų alelizmui nustatyti;
- kodėl vieniems genams būdinga tarpalelinė komplementacija (yra heteroaleliai), o kitiems ne (yra homoaleliai)?

Abu šie klausimai yra susiję. Norint atsakyti į pirmąjį klausimą, reikia išsiaiškinti, kodėl vyksta tarpalelinė komplementacija.

Monofunkciniai ir polifunkciniai baltymai. Genų skirstymas į homoalelius ir heteroalelius priklauso nuo genų koduojamų baltymų sandaros ir funkcijos. Baltymai pagal funkciją yra dviejų tipų: monofunkciniai ir polifunkciniai, o pagal sandarą gali būti sudaryti iš domenų.

> **Domenai** – tai baltymo dalys, kurioms būdingos tam tikros konkrečios funkcijos ir/arba sandaros autonomija. Tačiau polifunkciniai baltymai skirtingai paveldimi. Jie yra vieno arba kelių genų produktas.

Geriausiai tai galima parodyti sugretinant dvi bakterijų DNR polimerazes: DNR I polimerazę ir DNR III polimerazę. Pirmoji yra DNR pažaidų reparacijos fermentas, antroji yra replikacinė – vykdo DNR replikaciją.

Abu fermentai sudaryti iš domenų ir yra polifunkciniai: atlieka polimerizaciją – elongaciją 5′→3′ kryptimi nuo 3′-OH pradmens ir kartu yra nukleazės – pašalina neteisingai įjungtus nukleotidus. Taigi jos yra 3′→5′ egzonukleazės. Tačiau DNR III polimerazė – holofermentas iš 10 subvienetų. Ją koduoja bent septyni genai, ir jos korekcinę funkciją atlieka specialus (ε) polipeptidas.

DNR I polimerazę koduoja tik vienas genas. Tačiau ir DNR I polimerazėje yra fragmentai su skirtingomis funkcijomis: terminalinio

galo 36 kDa fragmentas, atliekantis 5′→3′ egzonukleazinę funkciją; didesniajam 70 kDa (Klenovo) fragmentui būdingos iš karto dvi funkcijos: 5′→3′ polimerazinė ir 3′→5′ egzonukleazinė (korekcinė). Vadinasi, ir šio tik vieno geno koduojamo baltymo skiriami du domenai.

Komplementacija ir požymio genetika. Dabar galima iš karto atsakyti į abu dėl tarpalelinės komplementacijos kilusius klausimus. Kaip alelizmo testas, komplementacija visiškai aiškaus atsakymo neduoda.

Komplementacija parodo, kad arba požymį lemia keli genai, arba genas yra funkciškai dalomas.

Komplementacija yra tolesnių tyrimų pamatas. Antai apie tai, ar genai aleliniai ar nealeliniai, galima spręsti iš **komplementacijos grupių vietos chromosomose**. Jeigu komplementacijos grupės nustatomos nutolusiuose lokusuose arba net skirtingose chromosomose, galima tvirtinti, kad požymį lemia du arba daugiau nealelinių genų. Netgi paprasčiausia F_2 analizė gali vienareikšmiškai išspręsti klausimą apie mutacijų aleliškumą. Kai F_1 pasireiškia komplementacija, o F_2 palikuonių skilimo santykis yra dihibridinio (pvz., 9:7, 9:3:4, 9:3:3:1) arba sudėtingesnių kryžminimų, mutacijos yra ne tik nealelinės, bet ir skirtingose, nehomologinėse chromosomose.

Sudėtingiau yra tuo atveju, kai abi komplementacijos grupės yra greta, kaip bakteriofago T_4 *rII* A ir B cistronų. Bet apie A ir B cistronus galima pasakyti, kad jiedu savarankiški, nealeliniai genai. Tarp jų yra genus skirianti nukleotidų seka – **tarpiklis.**

Heteroaleliai yra tie genai, kurių koduojami baltymai pagal sandarą/funkciją yra dalijami į domenus. Jiems būdinga tarpalelinė komplementacija.

Tad tarpalelinė komplementacija įrodo, kad genas yra dalus. Ji gali būti dingstis detalesnei geno vidinei sandarai tirti.

2.3. Geno sandara ir veikla

Ir to paties genomo genai skiriasi dydžiu, sandara ir galutiniu produktu. Pats didžiausias žmogaus raumenų distrofijos genas net

2000 kb dydžio. Normalus jo alelis koduoja stambų 500 kDa baltymą distrofiną. Bet ne tik koduojamas produktas lemia šio geno dydį. Genas turi didelę valdymui skirtą dalį ir apie 60 intronų (žr. toliau), kurie nekoduoja baltymo ir pašalinami iš bręstančios distrofino mRNR.

Dėl ilgų valdymo sekų ir intronų eukariotų genai apskritai yra gerokai didesni ir sudėtingesni už prokariotų.

Kiekvienas genas yra dalijamas į dvi dalis:
- valdymo (reguliacinę-akceptorinę),
- transkribuojamąją.

Geno valdymo dalyje yra nukleotidų sekos RNR sintezei pradėti ir sekos, su kuriomis sąveikauja valdymo (reguliacinių) genų produktai.

Nuo transkribuojamosios geno dalies sintetinama RNR. Transkribuojamoji geno dalis irgi turi valdymo sekų. Jos būtinos sėkmingai baltymo sintezei. Be to, genai, kurių koduojamasis baltymas įsijungia į membraną ar gabenamas už ląstelės ribų, turi specialias nukleotidų sekas, koduojančias vadinamąjį **signalinį polipeptidą**. Šis polipeptidas yra reikalingas baltymui įsiterpti į membranas arba jam pernešti už membranos ribų. Po to šis polipeptidas pašalinamas. Specialias nukleotidų sekas turi ir genai, kurių koduojamieji baltymai jungiasi su DNR – yra **transkripcijos veiksniai** (žr. p. 317). Kai kurie genai koduoja specialius baltymus **šaperonus** (žr. p. 320), kurie sukuria arba atkuria baltymų tretinę sandarą.

Pagaliau ne visi genai koduoja baltymus. Kiekvieno organizmo genome yra daug genų, kurių galutinis produktas yra RNR. Tai ribosominių (rRNR), pernašos (tRNR), mažųjų branduolio (mbRNR) bei citoplazmos (mcRNR) ribonukleorūgščių genai.

Pagal tai genai skirstomi į dvi grupes: 1) transkribuojamuosius, bet netransliuojamuosius genus (arba nukleotidų sekas), galutinis produktas šiuo atveju yra RNR; 2) transkribuojamuosius ir transliuojamuosius genus ir nukleotidų sekas – jų produktas yra baltymas.

Genome yra nukleotidų sekų, kurios yra netranskribuojamos ir netransliuojamos. Jų paskirtis labai įvairi (žr. III ir IV sk.)

2.3.1. Transkripcija (RNR biosintezė). Reguliacinės-akceptorinės geno dalies sandara

Transkripcija (lot. *transcriptio* – perrašymas) – tai matricinė RNR sintezė. **Matrica paprastai yra DNR. Kai genetinė medžiaga yra RNR, ji yra matrica.**

Visų RNR nukleotidų seka yra komplimentari DNR grandinei-matricai ir sutampa su kita DNR grandine (skiriasi tuo, kad vietoj timidilo rūgšties RNR yra uridilo rūgštis). Pirmasis transkribuojamasis nukleotidas vadinamas **starto tašku** ir žymimas +1. Nuo jo transkripcija visada vyksta 5′→3′ kryptimi (2.8 pav.). Šia kryptimi (**pasroviui**) nukleotidai nurodomi „+“ ženklu, o priešinga kryptimi (**prieš srovę**) nuo starto taško – su „–“ ženklu. Transkripciją atlieka RNR polimerazės.

Prokariotų yra tik viena bendra RNR polimerazė. Specifinė prokariotų genų transkripcija priklauso nuo papildomų veiksnių ir RNR polimerazės komplekso (žr. toliau).

Eukariotų transkribuojami branduolio genai skirstomi į 3 grupes pagal tai, kuri iš trijų RNR polimerazių vykdo transkripciją.

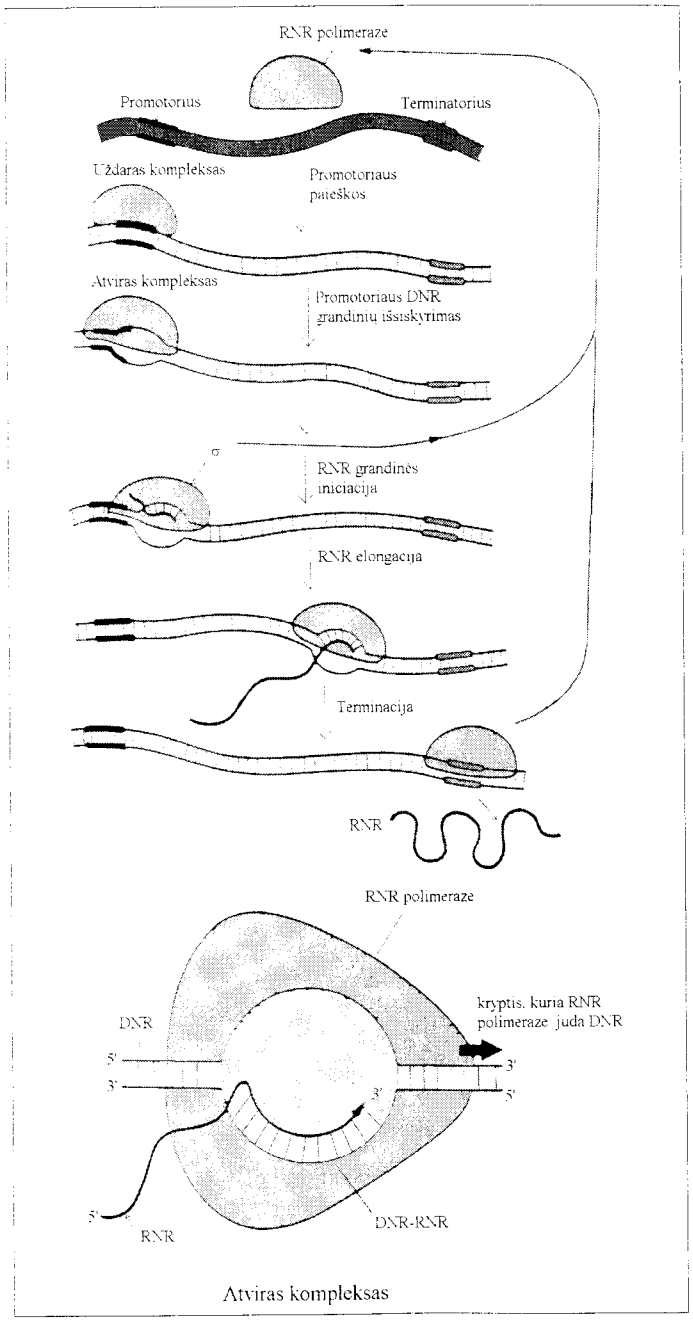
RNR I polimerazė lokalizuota branduolėlyje, kuris susidaro antrinėje chromosomos sąsmaukoje ir yra ribosominių RNR (rRNR) sintezės centras. Ši RNR polimerazė sintetina didelį pirminį transkriptą. Jis brendimo metu sukarpomas į 3-jų tipų rRNR: 18S; 5,8S ir 28S.

RNR II polimerazė transkribuoja transliuojamuosius genus. Jos transkriptas yra mRNR.

RNR III polimerazė transkribuoja mažųjų RNR – tRNR, 5S rRNR, mbRNR, mcRNR ir pan. genus.

RNR polimerazė tiesiogiai ar per tarpininkus atpažįsta reguliacinės-akceptorinės dalies nukleotidų seką, vadinamą **promotoriumi** (lot. *promotio* – pasistūmėjimas į priekį). Jų sąveika inicijuoja transkripciją.

Promotorius yra netranskribuojamas, bet prie jo jungiasi RNR polimerazė ir kiti baltymai, kurie būtini transkripcijai pradėti. Įvairioms RNR polimerazėms promotoriai yra skirtingi. Bakterijų polimerazės apglėbia DNR nuo –55 iki +20 bp. Įvairių genų promotoriuose išskiriamos **kanoninės sekos.** Tai 6–7 n.p. seka TATA blokas (prokariotų ji vadinama Pribnovo, o eukariotų – Hogneso-Goldbergo bloku). Kitos kanoninės sekos būdingesnės konkrečioms organizmų ir genų grupėms. Skiriasi ir šių sekų padėtis. Kanoninės sekos nustatomos statistiniais metodais.



2.8 pav. **Transkripcijos eiga**

Jose nurodyti tie nukleotidai, kurie šioje padėtyje dažniausiai pasitaiko. Be to, šalia pateikiami skaičiai rodo, kokiu dažniu (procentais) šioje padėtyje sutinkamas nukleotidas. Juo aukštesnis šis procentas, tuo konservatyvesnis nurodytas nukleotidas, ir atvirkščiai, kuo žemesnis procentas, tuo labiau šioje padėtyje nukleotidas varijuoja įvairių organizmų ir netgi to paties organizmo skirtingų genų promotoriuose. Pagal susitarimą didžiosiomis raidėmis nurodomi nukleotidai, kurių dažnis didesnis kaip 54%, mažosiomis – ne tokie konservatyvūs, bet dažniau negu esant atsitiktiniam pasiskirstymui pasitaikantys nukleotidai. Ta padėtis, kurioje nėra pirmenybės kuriam nors nukleotidui, žymima N.

Štai kaip atrodo bakterijų promotorių Pribnovo blokas (pateikiama dvigubai ilgesnė nukleotidų seka, negu Pribnovo bloko; šis paryškintas):

$$A_{46}T_{40}T_{43}G_{43}N\mathbf{T_{80}A_{95}t_{45}A_{60}a_{50}T_{90}}G_{37}$$

Palyginimui eukariotų promotorių Hogneso-Goldbergo blokas toks:

$$\mathbf{T_{82}A_{97}T_{93}A_{85}A_{63}/t_{37}A_{83}a_{50}/t_{33}}$$

Nors promotorius yra netranskribuojama nukleotidų seka, bet ji lemia daugelį svarbių geno ypatybių. Viena iš svarbiausių promotoriaus ypatybių – geno aktyvumas normalioje ir kraštutinėse (ekstreminėse) situacijose.

Prokariotų promotoriuose nustatytos keturios konservatyvios jų sandaros ypatybės/sekos, nuo kurių priklauso promotoriaus stiprumas:

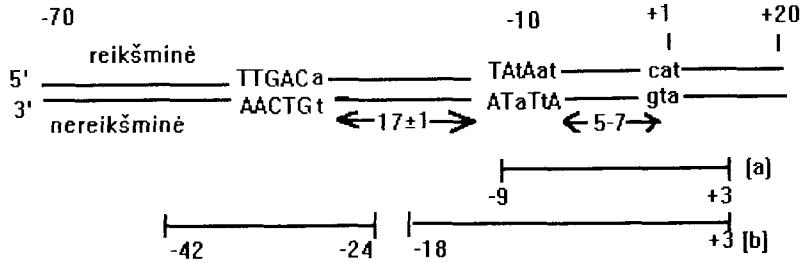
+1 – starto taškas,
−10 – TATAAT seka,
−35 – TTGACA seka,
– atstumas tarp šių dviejų nukleotidų sekų (16–18 bp).

Tačiau promotoriaus stiprumui reikšmingos ir nekonservatyvios nukleotidų sekos.

Konkrečių nukleotidų ir jų **sekų reikšmė promotoriuje nustatoma mutacijų metodais: pakaitomis** (keičiant vieną nukleotidą kitu) arba **delecijomis** (pavienių nukleotidų arba jų sekų iškritomis). Antai po TATA bloko delecijos transkripcija nenutrūksta, bet netiksliai pasirenkamas starto taškas, kuris eukariotų dažniausiai yra A, o prokariotų A arba G.

Prokariotų promotorius. *E. coli* ir kitų bakterijų TATA blokas nutolęs nuo starto taško 10 bp (–10). Tuo tarpu eukariotų genuose šios sekos nuotolis svyruoja –40–120 ribose. TATA blokas yra iš A–T porų, todėl šioje vietoje DNR grandinės lengvai atsiskiria. (Prisiminkite, kad tarp A=T yra dvi, o tarp G≡C – trys vandeniliniai ryšiai).

Antroji kanoninė seka yra įvairi. Prokariotų tai priklauso nuo to, koks **sigma** veiksnys ją atpažįsta. Tai polipeptidas – RNR polimerazės komplekso dalis (žr. toliau). Visas *E. coli* promotorius atrodo taip:



Viršuje (a) nurodytos ribos, kuriose transkripcijos pradžioje formuojasi atviras kompleksas (žr. 2.8 pav.). TATA blokas telpa į šias ribas.

Eukariotų promotorius kur kas sudėtingesnis. Įvairios eukariotų RNR polimerazės jungiasi su skirtingais promotoriais. Antai RNR III polimerazės promotoriai yra transkribuojamojoje geno dalyje.

Genų, kuriuos transkribuoja RNR II polimerazė, promotoriuje yra dviejų tipų kanoninės sekos:

- pagrindinės, su kuriomis sąveikauja RNR II polimerazė,
- specifinės, būdingos konkretiems genams arba palyginti nedidelėms genų grupėms, vadinamiesiems regulonams.

Nuo pagrindinių kanoninių sekų priklauso, kokiai stambiai genų (audinių specifinių, adaptacinių, konstitutyvių ir pan.) grupei priklausys genas (žr. IV sk.). Šias sekas atpažįsta **pagrindiniai transkripcijos veiksniai**. Tai valdymo genų koduojami baltymai, kurie atpažįsta pagrindines kanonines nukleotidų sekas ir su jomis jungiasi.

Eukariotų genų promotoriuose yra keletas pagrindinių nukleotidų sekų. Įvairūs jų deriniai lemia stambiąsias eukariotų genų grupes.

Be pagrindinės sekos, gali būti **motyvai** (pranc. *motif* – čia analogija muzikinio termino, reiškiančio pagrindinį elementą) – panašios į pagrindinę sekos.

Prokariotų ir ypač eukariotų genų labiau nutolusioje nuo starto taško dalyje (daugiau kaip –80–120 bp) yra nukleotidų sekos, kurias atpažįsta valdymo genų produktai. Visi genai, kurie sudaro vieną genų grupę – reguloną ir klauso vieno valdymo geno komandų, tokias sekas turi vienodas. Tas pats genas gali įeiti į kelias reguliacines genų grupes arba būti reguliuojamas kelių genų-reguliatorių. Toks genas turi atitinkamai daugiau sekų, skirtų valdymui.

Promotoriuose daugiau negu visoje kitoje genų dalyje yra **judriųjų genomo elementų įsiterpimo** (integracijos) **vietų** (žr. p. 140). Tai irgi specialios nukleotidų sekos. Jos būdingos arba genams, kurių veikla valdoma judriųjų genomo elementų, arba genams, kurie mutabilūs „pagal užsakymą".

Kai kurie genai turi du tris promotorius. Tai genai, kurie priklauso skirtingoms genų grupėms ir veikia skirtingais režimais: arba konstitutyviu, arba įvairiu adaptaciniu ir pan.

Skiriami trys transkripcijos etapai: pradžia, elongacija ir pabaiga.

Prokariotų transkripcijos **pradžia** yra tada, kai RNR polimerazė prisijungia prie promotoriaus (2.8 pav.). Tai vyksta tam tikroje (žr. aukščiau) promotoriaus vietoje. RNR polimerazės, pradžioje prisijungusios prie DNR atsitiktinai, juda DNR, kol suranda reikiamą nukleotidų seką. Ten susidaro **uždaras kompleksas**. Jame DNR yra dvigrandė. RNR polimerazės sudaro labai sudėtingus baltymų kompleksus, apie kurių dydį galima spręsti iš molekulinės masės. Ji būna iki 500 kDa. RNR polimerazei tiksliai prisijungti prie promotoriaus būtinas sigma (σ) subvienetas. Sigma padidina tikslumą atpažinti promotorių iki 10000 kartų! Sigma subvienetai gali būti įvairūs. Kai kurie iš jų jungiasi tik prie tam tikrų genų. Uždaras kompleksas virsta atviru kompleksu (2.8 pav.), kuriame iniciacijos vietoje išsiskiria DNR grandinės. Išskirtų DNR grandinių ilgis lygus 12–17 bp. Šiai stadijai būtini RNR polimerazės substratai – nukleozidtrifosfatai. Susintetinus 8–9 nukleotidų atkarpą, pasišalina sigma subvienetas ir prasideda kitas RNR sintezės etapas – **elongacija** (2.8 pav.).

Eukariotų transkripcijos **pradžia** yra kur kas sudėtingesnė. Tai priklauso nuo trijų skirtingų RNR polimerazių ir nuo sudėtingesnės promotorių sandaros.

Svarbiausia RNR transkripcijos pradžioje tiksliai nustatyti starto tašką. Pirmiausia tai priklauso nuo TATA bloko. Prie TATA bloko jungiasi TBP (angl. *TATA-binding protein*), paskui kiti veiksniai – TAF (angl. *TBP-associated factors*). Jų yra keletas. Tačiau promotoriuje svarbios ir kitos pagrindinės nukleotidų sekos.

Elongacija. Su RNR polimerazėmis sąveikauja kiti baltymai – **elongacijos veiksniai.** Jų kompleksas toliau transkribuoja RNR nuo DNR matricos. RNR sintezė vyksta 5′→3′ kryptimi.

Transkripcijos pabaiga (2.8 pav.) gerokai skiriasi prokariotų ir eukariotų, bet ji turi ir daug bendra. Pirmiausia abiejų organizmų grupių mRNR susidaro **terminatorius**. Tai įvairaus ilgio nukleotidų seka, sudaranti dvigrandę struktūrą **segtuką**. Segtukas yra RNR polimerazės kliūtis. Antra, RNR transkriptą nukerpa endonukleazės.

Prokariotų transkripcijos terminacijai svarbios **ribosomos**. Mat jos sąveikauja su dar nebaigta transkribuoti mRNR (žr. transliaciją). Ribosomos trukdo **ro (ρ) veiksniui** judėti transkriptu. Tačiau jau pasiekus jam beprasmį kodoną ribosomos prie jo nesijungia. Ro veiksnys netrukdomas praeina ir atskiria DNR–RNR hibrido grandines.

Nukleorūgščių (DNR ar RNR) sintezei, tarp jų ir transkripcijai, reikia didelių ATP ir GTP energijos išteklių.

2.3.2. Transkripto brendimas. Splaisingas. Introninė-egzoninė eukariotų genų sandara

Labai svarbios funkcinės geno sandaros ypatybės paaiškėjo palyginus pirminį geno produktą – transkriptą su mRNR, kuri dalyvauja transliacijoje. Ji labai pakeista. Pirminės RNR modifikacija vadinama **brendimu** (angl. *processing* – gaminio perdirbimas). Brendimas būdingas visiems transkriptams, bet sudėtingiausiai jis vyksta eukariotų branduoliuose. Tačiau RNR brendimas branduoliu neapsiriboja, jis vyksta ir tada, kai transkriptas transportuojamas per branduolio apvalkalėlio poras į citoplazmą, taip pat citoplazmoje. Ypač tų genų, kurių koduojamos RNR citoplazmoje gali būti neveiklios, atsarginės. Šių RNR aktyvacija susijusi su jų sandaros pokyčiais (žr. p. 329). Apskritai transkripto brendimas yra vienas iš genų veiklos valdymo būdų (žr. IV sk.).

Transkripto 5′ ir 3′ galų modifikacija. Tuoj pat po transkripcijos pradžios prie pre-mRNR prijungiama **kepurė** (angl. *cap* – kepurė). Tai vienas metilintas, dažniausiai guanino, nukleotidas (m^7G). Jis yra ne tik metilintas, bet ir invertuotas (pasisukęs 180°) ir jungiasi su kitu nukleotidu ne 5′→3′, o 3′→5′, todėl dar žymimas $m^7G^{5'}$ $ppp^{5'}$ N^mp. Invertuotas nukleotidas blokuoja mRNR 5′ galą ir yra reikalingas prisitvirtinti prie ribosomos.

Daugumos eukariotų genų mRNR 3′ gale yra **uodega**. Tai seka vien iš **adenilo rūgšties – poliA**. Išimtis – histonų ir rRNR genai. Daugumos jų mRNR neturi poliA sekos 3′ gale. PoliA yra prijungiama, bet prieš tai transkripto 3′ gale atskeliamos ilgos (šimtų n.)

nukleotidų sekos. Gene poliadenilinimo vietą lemia nukleotidų seka **AATAAA.**

Apkarpytos pre-mRNR ši seka yra per 11–30 nukleotidų nuo 3′ galo. PoliA ilgis ne tik nevienodas įvairiose mRNR, bet ir keičiasi molekulei senstant. Jos paskirtis yra apsauginė ir valdymo (žr. toliau). Be to, poliA inicijuoja baltymų jungimąsi prie mRNR. Tačiau ši seka nėra absoliučiai būtina. Kitais atvejais signalas AAUAAA gali būti labai nutolęs nuo transkripcijos terminacijos taško. Antai žinduolių β-globulino gene šis signalas yra per 1400 nukleotidų nuo transkripto 3′ galo. Prijungus poliA, paprastai vyksta **splaisingas,** tačiau jis nesustoja ir po to, kai poliA prijungimą blokuoja inhibitoriai. Tai terminas iš jūreivių (ir cirko artistų) atliekamo triuko: virvė karpoma ir karpoma, o galai kirpimo vietoje sujungti (angl. *splicing* – virvės surišimas, nepaliekant galų).

Pertraukta eukariotų genų sandara. Egzonai ir intronai. Splaisingas. Labai įdomūs rezultatai gauti sukryžminus genų inžinerijos metodais išskirtus genus su jų koduojama mRNR. DNR susidarė kilpos. Vadinasi, gene yra nukleotidų sekos, kurios praleistos RNR, nors jos ir yra geno viduje. Kryžminant DNR su pirminiu transkripcijos produktu pre-mRNR, kilpos nesusidaro. Gene yra nukleotidų sekos **intronai,** kurie transkribuojami, bet jų nėra galutinėje mRNR. Iš pre-mRNR šios sekos pašalinamos vykstant splaisingui. Išlikę subrendusioje mRNR transkripto fragmentai vadinami **egzonais.**

Dauguma eukariotų ir archebakterijų genų transkribuojamojoje geno dalyje yra pertrauktos sandaros – sudaryti iš egzonų ir intronų. Vykstant tipiškam splaisingui, intronai iš pre-RNR pašalinami.

Eubakterijų genuose intronai yra labai retos išimtys tačiau jų yra kai kuriuose bakteriofagų genuose. Antai bakteriofagas T_4 turi tris genus su intronais. Eukariotų genuose egzonų ir intronų dydis (ir tame pačiame gene) labai įvairuoja. Didžiausi intronai aptikti žinduolių *MHC* (audinių suderinamumo, žr. p. 297) ir drozofilos *Antennapedia* lokusuose – 70–100 kb.

Skiriasi genai ir **pagal intronų skaičių**. Jų visiškai neturi dauguma histonų, interferono genų. Trečdalis visų drozofilos 28S rRNR genų yra be intronų. Mielių 28S rRNR genuose intronų iš viso nėra, tuo tarpu jų mitochondrijų analogiškos rRNR genai turi po vieną

introną. Pasitaiko mielių kamienų, kurių mitochondrijų genai be intronų. Infuzorijos *Tetrahymena pigmentosa* šių RNR genuose vienų kamienų yra po 1 introną, o kitų nėra. Kokių nors funkcinių skirtumų tarp šių kamienų nepastebėta. Iš maždaug 400 mielių tRNR genų tik apie 40 turi po vieną introną. Jų dydis nuo 14 iki 64 bp.

Vištų kolageno genas turi net 51 introną. Tai daugiau kaip 86% viso geno. Nereikia manyti, kad intronai yra beprasmiai. Juose yra daug įvairių nukleotidų sekų, būtinų genų veiklai valdyti ir kt. Intronai gali koduoti polipeptidus arba ribozimus (fermentus – RNR molekules, ne polipeptidus), tarp jų ir katalizuojančius splaisingą.

Būtinos įvairių organizmų ir genų splaisingo sekos gana skiriasi. GU-AG sekos labai konservatyvios (apie 100%).

Norint tiksliai iškirpti introną, būtinos trys konservatyvios nukleotidų sekos pačiame introne: nukleotidų seka introno 5′ gale, atšakos sritis – konsensusas UACUAAC ir introno 3′ gale Py_nNCAGN. Atšakos seka būtina laso tipo kilpai susidaryti (2.9 pav.).

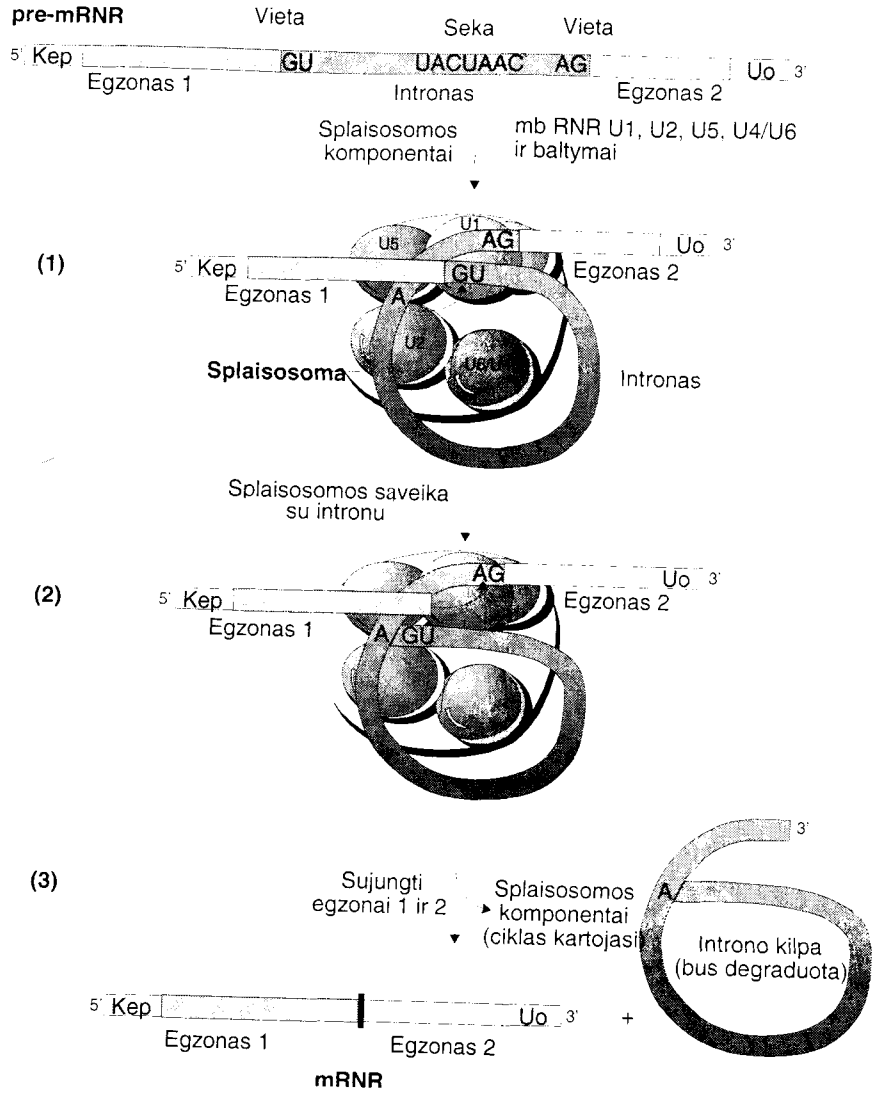
Splaisingo tikslumas priklauso ir nuo gretimų nukleotidų (konteksto).

Splaisingas vyksta bent 4 būdais. Pagal tai intronai skirstomi į grupes. Trijuose splaisingo būduose daugiau ar mažiau reiškiasi **ribozimai.** Dažniausiai susidaro **splaisosoma**. Joje yra mažosios branduolio RNR (mbRNR): U1, U2, U4, U5, U6 ir keli baltymai (2.9 pav.). Splaisosoma suartina introno 5′ galą su vidine – **atšakos seka**. Susidaro laso pavidalo figūra. Ji iškerpama, o dviejų egzonų galai sujungiami. Po to splaisosoma ir iškirptas intronas pasišalina.

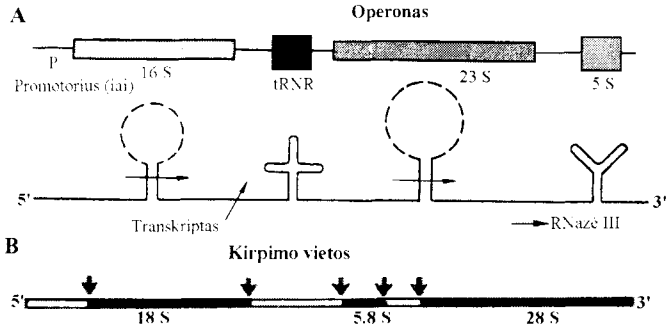
Ribosominių ir transportinių RNR brendimas. Bręsta ne tik genų, koduojančių baltymus, bet ir rRNR, tRNR pirminiai transkriptai. Ribosominių RNR genai sutelkti vienoje vietoje ir sudaro sankaupą. Nuo jos transkribuojama viena bendra pre-RNR. Dėl šios priežasties tokios genų sankaupos vadinamos **transkriptonais**.

Iš pre-rRNR transkripto iškerpami ne tik intronai (jeigu jie yra), bet ir skiriančios vieną geną nuo kito nukleotidų sekos. Tai **transkribuojamieji tarpikliai**. Jie skiria vienas RNR nuo kitų bendrame transkripte. Susidaro kilpa. Ji iškerpama (2.10 pav.).

Eukariotai pasižymi dar viena rRNR brendimo ypatybe. Ribosominių rRNR genai-sankaupos yra daug kartų pakartoti, sutelkti vienoje vietoje, todėl ir jų transkriptas sutelktas vienoje vietoje – branduolėlyje. Čia formuojasi ir ribosomos subvienetai – rRNR sudaro kompleksus su baltymais.



2.9 pav. **Splaisingo eiga, dalyvaujant splaisosomai:**
[ ] ir [ ] – egzonai; [ ] – intronas; Kep – kepurė; Uo – uodega; *1* – Splaisosoma – U1 ir kitos mbRNR suartina introno 5′ galą su atsišakojimo seka; *2* – intronas kerpamas 5′ gale, o introno atsišakojimo sekoje esantis A sujungiamas su introno 5′ gale esančiu G; *3* – kerpamas introno 3′ galas, laso pavidalo kilpa, intronas pasišalina, o egzonų 1 ir 2 galus sujungia ligazės



2.10 pav. **Pre-rRNR splaisingas:**
A – bakterijų operonas; *B* – žinduolių operonas

Pernašos (transportinių) RNR introną (jis tik vienas) pašalina endonukleazė, o egzonus sujungia RNR ligazės. Kai transkriptas yra bendras (gali būti kelių skirtingų tRNR genų sankaupos), jis irgi karpomas.

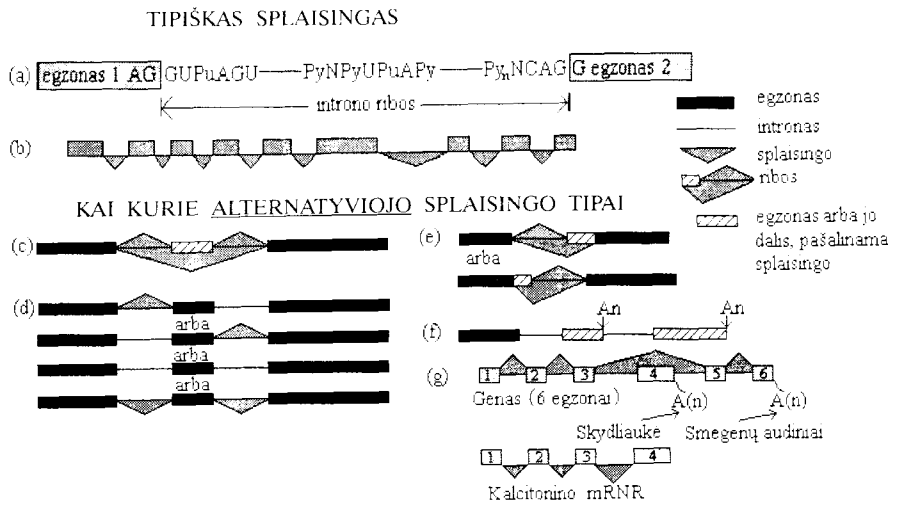
Šios tRNR modifikuojamos ir kitokiu būdu. Susidaro specifiniai minoriniai nukleotidai, kurių nėra kitose RNR, pavyzdžiui, keletas uracilų paverčiami dihidrouracilais, adeninas deaminuojamas į inoziną ir t.t. Eukariotams būdingos ir transkribuojamosios tRNR genų reguliacinės sekos, kurias fermentai pašalina bręstant tRNR. Be to, prie kiekvieno tRNR 3′ galo prijungiamos **CCA** sekos.

Egzoninės-introninės genų sandaros reikšmė. Alternatyvusis splaisingas. Kokia prasmė geno sandaroje turėti intronus, kodėl vieni genai juos turi, kiti ne? Kaip minėta, intronuose yra daug reguliacinių nukleotidų sekų. Kai kurių genų intronai gali koduoti ir polipeptidus. Be to, intronai gali būti judrieji.

Neabejotinai egzoninė-introninė geno sandara padidina genetinės rekombinacijos tikimybę, ypač geno ribose. Dėl nekoduojančių sekų labai pailgėja genas, kartu atitinkamai didėja krosingoverio tikimybė. Manoma, kad intronai yra rezervas ilgainiui naujoms geno savybėms, funkcijoms formuotis. Bet ne tai svarbiausia.

Jau vien tai, kad intronus turi archebakterijų genai, vertė manyti, kad egzoninė-introninė geno sandara lemia funkcinį organizmo labilumą, geresnį prisitaikymą prie kintančios aplinkos. Mat archebakterijos gali gyventi labai neįprastomis, sunkiomis sąlygomis: aukštoje temperatūroje, rūgščioje terpėje ir kt. Pasišalinant vienam ar kitam intronui, gali susidaryti skirtingos RNR.

Egzoninės-introninės geno sandaros reikšmė galutinai paaiškėjo tik tada, kai buvo įrodytas **alternatyvusis splaisingas.** Jis pasireiškia labai įvairiai. Kai kurie jo tipai pavaizduoti 2.11 pav.



2.11 pav. **Tipiškas (*a, b*) ir alternatyvusis (*c – f*) splaisingas**:

a – nukleotidų sekos – konsensusai dviejų „egzonas-intronas-egzonas" ribose; *b* – tipiškas splaisingas geno, turinčio daug egzonų, įvairaus dydžio egzonai ir intronai; *c* – gali būti iškerpami ne tik intronai, bet ir egzonas(ai); *d* – alternatyvus intronų splaisingas; *e* – alternatyviai šalinama dalis egzono; *f* – to paties geno keli egzonai turi poliadenilinimo saitą (A_n); N – bet kuris nukleotidas; Pu – bet kuris purinas; Py – bet kuris pirimidinas; *g* – alternatyvus kalcitonino pre-mRNR splaisingas; visais atvejais (*c–e*) gali vykti ir tipiškas splaisingas

1. Iš to paties transkripto vienu atveju pašalinami visi intronai, 2.11 pav., *g*, antruoju – ne tik intronai, bet ir dalis egzonų (2.11 pav., *c, g*), pateiktas ir konkretus pavyzdys – tas pats kalcitonino genas koduoja du skirtingus baltymus: viena subrendusi mRNR (egzonai *1, 2, 3, 4*) – kalcitoniną, o kita mRNR – specifinį audinių baltymą, aptinkamą smegenyse.

2. Alternatyviai šalinami intronai (2.11 pav., *d*). Tik maža dalis drozofilos polinių ląstelių (žr. p. 357) virsta generatyvinėmis, t. y. tik tos, kuriose judriojo genomo elemento P koduojama pre-mRNR patyrė splaisingą. Po splaisingo mRNR koduoja baltymą, aktyvinantį genų veiklą, o mRNR be splaisingo, atvirkščiai, koduoja baltymą, kuris slopina generatyvinių ląstelių vystymąsi – yra represorius. Taigi splaisingas valdo genų veiklą ir ląstelių diferenciaciją.

3. Gali būti pasirinktinai šalinamas ne visas egzonas, o tik dalis jo (2.11 pav., *e*).

Alternatyvusis splaisingas turi būti numatytas geno sandaroje. Pvz., poliadenilinimo seką gali turėti ne tik paskutinis, bet ir kiti egzonai (2.11 pav., *f*).

Taigi iš to paties geno, jam nesikeičiant, dėl įvairiai atliekamo splaisingo gali susidaryti skirtingos subrendusios RNR.

Trans-splaisingas yra dar vienas būdas baltymų įvairovei susidaryti, nesikeičiant genams. Tiesiogine prasme susidaro hibridinė mRNR, susijungus kovalentiniais ryšiais dviejų genų koduojamos pre-mRNR fragmentams. Taip atsitinka tripanosomų mikrovamzdelių baltymo tubulino pre-mRNR. Nematodo *Caenorhabditis elegans* aktino ir kelių kitų genų lyderinė seka koduojama atskirai kitoje vietoje, ir transkriptas yra prijungiamas. Dumblių *Chlamydomonas* viename iš chloroplasto genų (*psa*) pirmasis egzonas yra per 50 kb nuo antrojo egzono, o šis – per 90 kb nuo trečiojo egzono. Tarpuose (intronuose) yra kitų genų. Panašiai yra žinduolių pagrindiniame audinių suderinamumo lokuse (*MHC*).

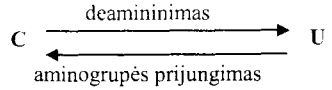
RNR redagavimas. Tai irgi būdas sukurti RNR ir baltymų įvairovę, nesikeičiant genui. Be to, šiuo atveju mRNR atsiranda sekos, arba nukleotidai, kurių nėra pačiame gene.

Buvo nustatyta, kad į pirminį transkriptą įterpiami arba, atvirkščiai, iš jo iškerpami pavieniai nukleotidai arba nukleotidų sekos. Dažniausiai U nukleotidas. Tokie mRNR pokyčiai vadinami **redagavimu**.

Šiuo metu skiriami bent trys **RNR redagavimo tipai. Pirmasis** – įterpiamas arba iškerpamas vienas nukleotidas. Tai rėmelio poslinkio mutacijos imitacija. Pasekmės visiškai tos pačios. Nuo nukleotido įterpimo arba šalinimo vietos visų kodonų skaitymas mRNR transliacijos metu pasislenka.

Antrasis redagavimo tipas – įterpiama arba iškerpama daug nukleotidų. Toks redagavimo tipas aptiktas įvairiuose žiuželiniuose – *Trypanosoma, Leishmania.*

Trečiasis būdas – tik vieno nukleotido pakeitimas kitu. Jis aptiktas daugelio aukštesniųjų augalų mitochondrijose ir chloroplastuose. Nuo C pašalinama aminogrupė, ir tada C virsta U; arba atvirkščiai, prie U prijungiama aminogrupė, ir šis virsta C:



Tai tikrai vieno nukleotido virtimas kitu, **konversija**. Tokiu būdu redaguojamos ir kai kurios žinduolių mRNR. Antai didžiuliame pirminiame žinduolių apolipoproteino B geno transkripte, kuris koduoja 4563 aminorūgštis, 2153-iame kodone **C** pakeitus **U**, vietoj kodono **CAA** atsiranda beprasmis kodonas **UAA**:

$$\boxed{C}AA \rightarrow \boxed{U}AA$$

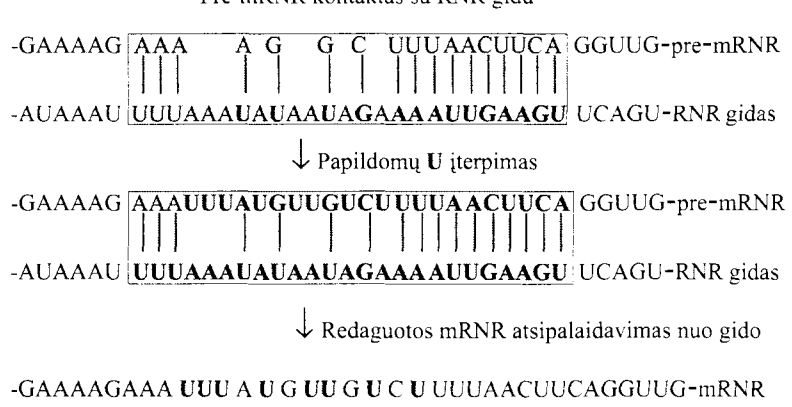
Pradinė mRNR koduoja stambų (512 kDa) B apolipoproteiną kepenų ląstelėse, o po redagavimo koduojamas perpus trumpesnis (iki nonsenso) B apolipoproteinas žarnyno ląstelėse. Dumblio *Spizellomyces punctatus* ir amebos *Acanthamoeba castellanii* mitochondrijų tRNR genų transkripte pirimidinas keičiamas purinu arba A keičiamas G. Nauda akivaizdi. Šių organizmų mitochondrijų DNR yra iš viso tik 8 tRNR genai, o dėl redagavimo susidaro 24–25 skirtingos tRNR.

To paties geno transkriptas redaguojamas įvairiose vietose. Tai sukuria tos pačios RNR įvairovę – **populiaciją**, o jeigu ši yra mRNR, – tai ir **baltymų populiaciją** (izoformas).

Redagavimą atlieka specialūs baltymai. Jie įvairūs, priklauso nuo redagavimo tipo. Šie baltymai vadinami **editazėmis** (angl. – *double strand RNA-specific editase*). Mat dažniausiai redagavimui būtinos specialios RNR. Jos naudojamos kaip matricos naujiems nukleotidams įterpti į RNR (2.12 pav.). Tokios RNR vadinamos **gidais** (**gRNR**). Editazių genų defektai (mutacijos), sutrikęs valdymas, pakitusi veikla, arba veikla ne tose ląstelėse, kuriose normaliai turėtų genas veikti (pvz., kepenų ląstelėse gaminasi žarnyno B apolipoproteinas), sukelia žmogui ligas. Antai editazės geno *RED1* sutrikimai sukelia fatalią epilepsiją.

Pirminio transkripto pokyčiai brendimo metu yra būdas sukurti RNR ir baltymų įvairovę nesikeičiant genui; RNR įvairovė sukuriama:

- alternatyviu splaisingu arba trans-splaisingu,
- pre-RNR redagavimu,
- baltymų įvairovę padidina pokyčiai transliacijos metu, tarp jų ir atsiradę dėl tRNR modifikacijos šioms RNR bręstant.



2.12 pav. **Pirminės mRNR redagavimas, dalyvaujant RNR gidui:** (*Leishmania* citochromo b pre-mRNR/mRNR atkarpa: įterpti U paryškinti).

2.3.3. Transliacija. Baltymo sintezė. Transliuojamosios geno dalies sandara

Transliacija – tai baltymo sintezė „ribosomų+mRNR“ komplekse. Aminorūgščių seka polipeptide yra užkoduota mRNR.

Baltymo sintezė vyksta šiais etapais:

- aminorūgščių aktyvinimas ir prijungimas prie tRNR,
- „ribosomų + mRNR“ komplekso susidarymas,
- transliacija, kuri irgi yra skirstoma į etapus: **iniciacijos, elongacijos, terminacijos, reiniciacijos** (pastaroji, matyt, ne visuose organizmuose ir ne visų mRNR).

Aminorūgščių aktyvinimas ir prijungimas prie tRNR galėtų būti skirstomi į du etapus, bet juos katalizuoja tie patys fermentai – aminoacil-tRNR sintetazės. Šie fermentai yra saviti kiekvienai aminorūgščiai. Aminorūgštys aktyvinamos irgi etapais, dalyvaujant ATP ir susidarant aminoaciladenilatams (smulkiau B. Juodkos knygoje „Nukleino rūgščių chemijos ir biochemijos pagrindai“).

Pernašos RNR (tRNR) yra savitos ne tik kiekvienai aminorūgščiai, bet ir kodonams. Tačiau dėl genetinio kodo nevienareikšmiškumo jų gali būti mažiau arba daugiau, negu turėtų būti pagal kodonų skaičių. Mažiausias tRNR skaičius yra mitochondrijose – tik 24. Dažnesnis tRNR perteklius – daugiau negu jų turėtų būti. Ypač didelis perteklius yra eukariotų tRNR. Tokio pertekliaus priežastis ta, kad kodas yra nevienareikšmis specializuotose ląstelėse, konkrečiuose genuose dėl tRNR modifikacijos (minorinių nukleotidų).

Aminoacil-tRNR sintetazės labai tiksliai prijungia aminorūgštį. Tai pirmasis atpažinimo reiškinys transliacijoje. Nuo to, kaip tiksliai jis vyksta, labai priklauso tiksli galutinio mRNR genų veiklos produkto baltymo sintezė. Vadinasi, šiam tikslui turi būti priemonių sistema.

Pirmiausia aminorūgštis tiksliai prijungiama prie aminoacil-tRNR sintetazės. Pastarojoje yra trys prijungimo centrai: aminorūgšties, ATP ir tRNR. Antra, sintetazė tiksliai jungiasi su atitinkama tRNR. Įvairios sintetazės sąveikauja su tRNR skirtingais būdais. Ir pagaliau trečia, tRNR tiksliai atpažįsta mRNR kodoną.

Klaidų gali būti padaroma bet kuriame iš minėtų trijų etapų, bet jos ištaisomos. Vadinasi, visuose trijuose etapuose dar yra kontrolės – klaidų ištaisymo būdai. Paskutiniame – „kodonas–antikodonas“ sąveikos – etape klaidas taiso ir ribosomos. Vienas iš tRNR reparacijos fermentų yra tRNR nukleotidtransferazė. Šis fermentas akceptorinio stiebelio 3′ gale prijungia arba pataiso nukleotidų seką CCA, kai šios sekos nėra arba ji nepilna.

Aptikta mutacijų, pažeidžiančių aminorūgšties jungimąsi prie sintetazės, o šios – jungimąsi su tRNR.

Ribosomos yra organizacinis transliacijos centras.

Jos yra vienos iš nedaugelio eukariotų nemembraninių organoidų, kuriems būdingas savaiminis susiformavimas iš į jų sudėtį įeinančių biopolimerų. Šį procesą pavyko atkurti *in vitro*. Šiuo būdu gauta daug žinių apie ribosomų sandarą, rRNR sąveiką su ribosomų baltymais. Ribosomos sudarytos iš dviejų subvienetų. Prokariotų ribosomose baltymų yra mažiau. Ir patys subvienetai, ir visa eukariotų ribosoma yra didesnė už prokariotų ribosomą. Eukariotų ribosomų RNR taip pat stambesnės: didžiajame subvienete (60S) yra 28S, 5,8S ir 5S rRNR, mažajame subvienete (40S) – 18S rRNR. Atitinkamai prokariotų didžiajame subvienete yra 23S ir 5S rRNR, mažajame subvienete – 16S rRNR.

Ribosomų padėtis eukariotų ląstelėse yra kitokia negu prokariotų. Pirma, eukariotams būdingos polisomos (arba poliribosomos). Tai vienos mRNR ir kelių ribosomų kompleksas. Polisoma yra lyg nedidelė gamyklėlė, gaminanti vieno tipo baltymą. Mat ant kiekvienos ribosomos, įeinančios į polisominį kompleksą, nuo tos pačios mRNR vienu metu sintetinama po vieną baltymą. Tokia sintezė labai intensyvi. Antra, ribosomų išsidėstymas priklauso nuo ląstelės diferenciacijos. Tai ypač būdinga toms ribosomoms, kurios yra ant grūdėtojo endoplazminio tinklo. Jo sandara ir funkcija (įvairių medžiagų specifinė sintezė ir pirminė pernaša), kaip žinome, lemia ląstelės specializaciją.

Ribosomose yra šie jų veiklai reikalingi **centrai** (vietos):

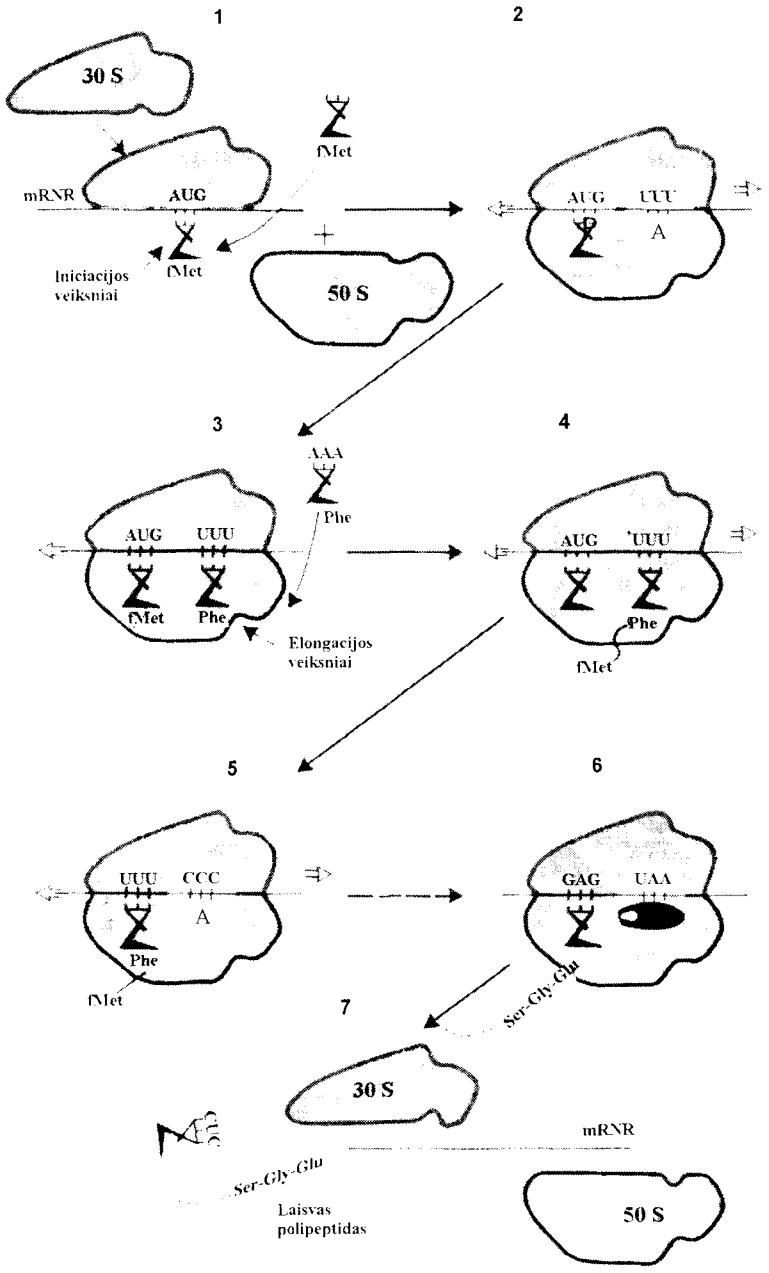
- **aminoacilininis (A)** – aminoacil-tRNR jungimosi sritis,
- **peptidilinis (P)** – peptidil-tRNR jungimosi sritis,
- **išlaisvinimo (E)** – nereikalingos tRNR išlaisvinimo,
- **atpažinimo (R)** – beprasmio kodono atpažinimo sritis (2.14 pav.).

Transliacijos pradžia (2.13 pav., *1, 2*) prasideda nuo to, kad susidaro kompleksas:

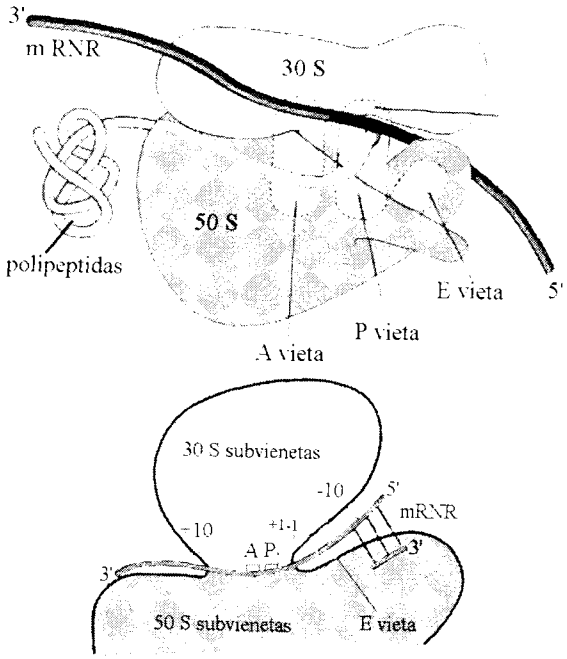
30 (arba 40) S ribosomos subvienetas ×
× mRNR·fMet-$tRNR_f^{Met}$·IF2·GTP

Speciali iniciacijos fMet-tRNR (eukariotų – Met-tRNR) prisijungia prie komplekso, kai vienoje iš ribosomos vietų – A saite atsiduria iniciacijos kodonas, dažniausiai AUG.

E saitas – nereikalingos tRNR išlaisvinimo (lot. *exit*) sritis ribosomoje, be savo tiesioginės paskirties, reguliuoja transliaciją. Kol ši vieta užimta, A saito giminingumas aminoacil-tRNR yra labai sumažėjęs, todėl transliacija vyksta „žingsnis po žingsnio" – kodonas po kodono.



2.13 pav. ***Escherichia coli* transliacijos eiga:**
1–2 – iniciacija; *3–5* – elongacija; *6–7* – terminacija



2.14 pav. **Ribosomos-mRNR kompleksas:**
viršuje – polipeptido sintezė ir mRNR sąveika su A, P ir E vietomis: apačioje – A, P vietos ir kontaktas su 16S rRNR

R saitas (lot. *recognition* – atpažinimas) kol kas tik postuluojamas: RNR slenka ribosoma. Pastaroji tiesiog „ieško" atitinkamų nukleotidų sekų-kodonų. Kai prie komplekso prisijungia 50 (60)S ribosomos subvienetas, galutinai susiformuoja A ir P saitai. Pasiruošta transliacijai.

Kompleksas susidaro ir prasideda transliacija dalyvaujant specialiems baltymams. Jie vadinami ***iniciacijos veiksniais.*** Jų prokariotai turi 3: IF1, IF2, IF3, eukariotai – 10. Juos nesunku atskirti pagal užrašymo būdą: prieš visų tipų eukariotų veiksnius rašoma e: eIF1, eIF5 ir t. t.

Iniciacijos etapas baigiasi, kai ribosomos A saite atsiduria iniciacijos kodonas. Su juo kontaktuoja savo antikodonu iniciacijos aminoacil-tRNR.

Elongacija (žr. 2.13 pav., *3–5*) – **polipeptidinės grandinės polimerizacija.** Ji prasideda nuo to, kad iniciacijos aminoacil-tRNR atsiduria P saite, o į A saitą pagal „kodonas-antikodonas" sąveiką stoja kita aminoacil-tRNR. Susidaro polipeptidinis ryšys. Po to ribosomose vėl vyksta poslinkis po poslinkio per vieną mRNR kodoną. Ribosomų vaidmuo itin svarbus. Jos tikrina, ar teisingai į A saitą pastatoma aminorūgštis. Šis reiškinys vadinamas **ribosomine korekcija.** Transliacijos tikslumui vieno tikrintojo nepakanka – yra dar specialūs baltymai.

Pabaiga (2.13 pav., *6, 7*) baigiasi vienu kuriuo iš terminacijos kodonų. Tačiau, kaip minėta ankstesniuose skyreliuose (žr. 2.1.3 ir 2.1.5), tai labai sudėtingas transliacijos etapas. Jame dalyvauja **terminacijos veiksniai.** Jie žymimi atitinkamai RF arba eRF. Vienas iš jų (RF3) reguliuoja ląstelių dalijimąsi.

Baltymų brendimas. Naujai susintetintas polipeptidas įvairiais būdais modifikuojamas. Polipeptido modifikacijos daugeliu atžvilgiu mena pre-RNR brendimą. Polipeptidas net yra karpomas ir vėl sujungiamas arba baltymas sujungiamas iš atskirų polipeptidų – domenų (žr. p. 297). Tai labai panašu į RNR splaisingą.

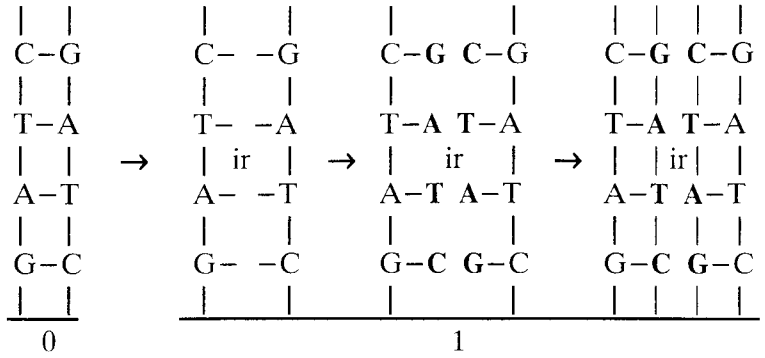
Kaip minėta, reikiamu momentu šalinamas signalinis polipeptidas.

Nuo daugelio baltymų pašalinama ir aminorūgštis, nuo kurios prasidėjo polipeptido sintezė. Prokariotų tai formilmetioninas, o eukariotų – metioninas. Dažniausiai baltymai prasideda kuria nors kita aminorūgštimi. Vadinasi, šiuo atveju formilmetioninas (arba metioninas) buvo atskeltas. Kai prokariotų baltymas prasideda metioninu, nuo formilmetionino galėjo būti atskelta formilo grupė. Visa tai atlieka specialūs fermentai.

2.4. DNR replikacija

2.4.1. DNR replikacijos įrodymai ir su jais susiję DNR tyrimo metodai. Pusiau konservatyvi DNR sintezė

Pasak Vatsono ir Kriko (žr. 1.2.2. ir 2.1.), DNR grandinės per nepatvarius vandenilinius ryšius gali viena nuo kitos atsiskirti. Jeigu iš aplinkos prie vienos ir kitos grandinės prisijungia nukleotidai ir po to jungiasi tarpusavyje, susidaro dvi naujos molekulės, visiškai tokios pat, kaip senoji molekulė. Be to, pusė naujos molekulės, tiksliau viena jos grandinė, yra ištisai iš pradinės molekulės:



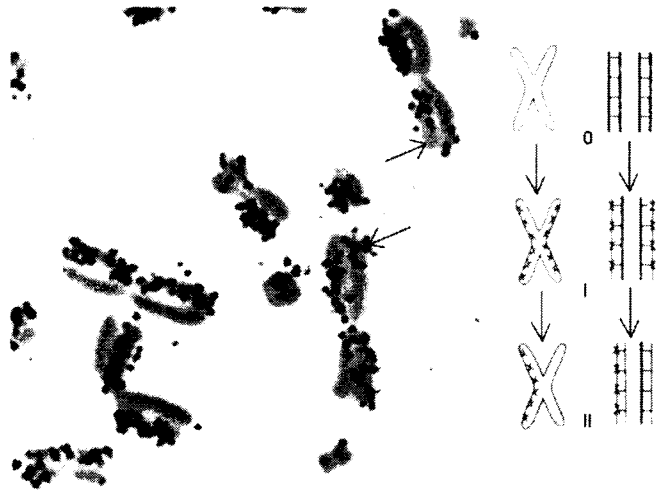
Naujose DNR grandinėse nukleotidai įjungiami komplementarumo matricai principu. Jei matricoje yra A, tai naujoje grandinėje T, jei matricoje G, tai naujoje grandinėje C, ir atvirkščiai. Primename, kad tai lemia vandenilinių ryšių skaičius: tarp G ir C – trys, tarp A ir T – du (žr. 1.11 pav.).

Šiuo metu niekam nekelia abejonių **pusiau konservatyvi DNR sintezė** (naujose DNR molekulėse viena DNR grandinė yra sena, o kita – nauja), arba kitaip **replikacija** (senoji grandinė yra matrica naujai grandinei sintetinantis, ir dvi naujos DNR molekulės yra visiškai tokios pat kaip senoji molekulė). Tačiau buvo laikas, kai tai reikėjo įrodyti. Šiuo metu šie įrodymai būtų tik mokslo istorija, jeigu jie nebūtų **pagrindiniai molekulinės genetikos metodai**. Jų atradimo istorija geriau atskleidžia šių metodų esmę.

Pirmiausia buvo nustatyta, kad **DNR grandinės gali viena nuo kitos atsiskirti ir vėl susijungti vandeniliniais ryšiais**. Taip pat buvo išskirti fermentai **DNR polimerazės**, atliekantys DNR sintezę. Bet paaiškėjo, kad sintezei reikia šiek tiek senųjų DNR molekulių, ir naujosios DNR molekulės yra visiškai tokios pačios kaip senosios molekulės. Vadinasi, DNR sintezei būtinos **matricos**.

DNR grandinių išsiskyrimo ir susijungimo metodas taikomas labai įvairiai. Svarbiausias jų – **molekulinė hibridizacija**. DNR polimerazės ir matricos naudojamos įvairioms polinukleotidų sintezėms *in vitro* (žr. toliau).

Specifinis DNR žymėjimas ir autoradiografija. 1957 m. Teiloras (J. H. Taylor) pasiūlė metodą, kaip DNR specifiškai žymėti radioaktyviuoju izotopu, o žymės įsijungimo vietą chromosomoje nustatyti autoradiogramoje. Tam tikslui naudotas **tričiu žymėtas timidinas**. Tai timino nukleozidas (timinas+deoksiribozė). Jis tinkamas dėl dviejų priežasčių:



2.15 pav. **Pupų chromosomų žymėjimas ^{3}H-timidinu:**
kairėje – chromosomos II dalijimosi metafazėje (pagal J. H. Taylor, 1957); dešinėje – chromosomos ir DNR prieš bandymą (0), po pirmojo (I) ir antrojo (II) dalijimųsi. Įvykę seserinių chromatidžių mainai (pora jų nurodyti rodyklėmis)

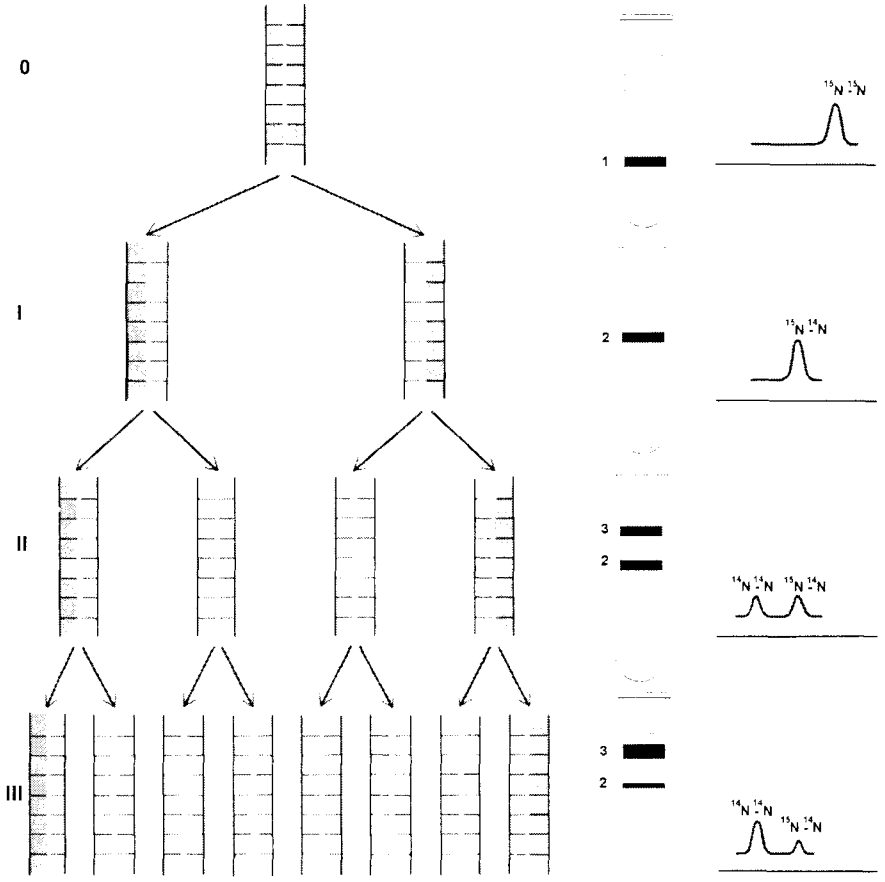
a) DNR yra timinas, kurio nėra RNR (ten vietoj jo yra uracilas), todėl žymėtasis timidinas įsijungia tik į DNR ir kituose junginiuose jo nebūna; b) timidinas skverbiasi į ląsteles lengviau negu timinas. Žymint tričiu, galima tiksliai nustatyti įsijungimo vietą, nes tričio išspinduliuojamų β-dalelių trekai labai trumpi, todėl ten, kur įsijungęs tritis, autoradiogramose susidaro taškas.

Taip buvo žymėtos pupų šaknelių meristemos ląstelės. ^{3}H-timidinas panaudotas tik prieš pirmąjį ląstelių dalijimąsi (po to šaknelės būdavo nuplaunamos). Kaip ir buvo tikėtasi pagal numatytą schemą (2.15 pav.), po pirmojo dalijimosi buvo pažymėtos abi chromatidės, o po antrojo ląstelių dalijimosi – tik viena. Tai patvirtina pusiau konservatyvią DNR sintezę.

DNR autoradiografijos ir žymėjimo radioaktyviaisiais izotopais metodai plačiai taikomi įvairiems tyrimams eukariotų ląstelėse, ypač DNR sintezei tirti.

Šiuo metu yra keletas būdų konkrečioms DNR molekulėms žymėti, tarp jų ir **neradioaktyvusis žymėjimas**.

Pastaruoju metu stengiamasi kiek įmanoma nežymėti DNR radioaktyviaisiais izotopais. **Neradioaktyviojo žymėjimo būdai**: 1) gali būti prijungiamos **nukleotidų sekos, specifiškai** reaguojančios su kai kuriais **dažais**; 2) **naudojami nukleotidų-biotino dariniai**, prie biotino liekanos prijungiamas fermentas (krienų peroksidazė arba šarminė fosfatazė, fermento substratas virsta spalvotomis nuosėdomis –



2.16 pav. ***Escherichia coli* DNR frakcionavimas ultracentrifuguojant tankio gradiente** (Mezelsono ir Stalio bandymas):
0 – prieš bandymą, ^{15}N-^{15}N – viena frakcija; I – po pirmosios replikacijos, ^{15}N-^{14}N – viena frakcija, pakitusi jos padėtis; II – po antrosios replikacijos, ^{15}N-^{14}N (padėtis ta pati kaip I), ir ^{14}N-^{14}N – iš viso dvi frakcijos; III – po trečiosios replikacijos. ^{14}N-^{14}N (jos po kiekvienos naujos replikacijos daugėja) ir šiek tiek ^{15}N-^{14}N

taip aptinkama jo vieta; 3) prijungiamas **digoksigeninas** iš augalo rusmenės (*Digitalis*). Jo vieta nustatoma arba specifiniu antikūnu, arba liuminescenciniais dažais.

Ypač svarbu neradioaktyviai žymėti dažant DNR ir kitus biopolimerus (RNR, baltymus) *in situ* – ląstelėse arba organoiduose, konkrečiose chromosomose. Neradiaoktyviojo dažymosi vieta dažniausiai nustatoma liuminescenciniu mikroskopu.

DNR frakcionavimas ultracentrifuguojant tankio gradiente. Galutinai DNR replikaciją įrodė 1958 m. Mezelsonas (M. Meselson) ir Stalis (F. W. Stahl). Jie surado būdą, kaip frakcionuoti DNR molekules, ultracentrifuguojant tankio gradiente (įvairaus tankio sluoksniuotame tirpale). Įvairios lyginamosios masės DNR molekulėms gauti bakterijos *Escherichia coli* ilgą laiką buvo auginamos terpėje, kurioje vietoj lengvojo azoto ^{14}N buvo jo sunkusis izotopas ^{15}N. Po to bakterijos buvo perkeltos į terpę su ^{14}N, periodiškai išskirta DNR ir ultracentrifuguota cezio chlorido tankio gradiente. Pusiau konservatyviu būdu sintetinamos DNR ultracentrifugavimo rezultatai pavaizduoti 2.16 paveiksle.

Didžiausias buvo pradinės DNR (0) tankis. Visoms ląstelėms pasidalijus vieną kartą (I), DNR tankis mažesnis, bet turėtų būti tik viena DNR frakcija, nes visų molekulių vienoje grandinėje (senojoje) yra ^{15}N, o kitoje (naujoje) – ^{14}N. Pasidalijus ląstelėms du kartus, ultracentrifuguojant turėtų susidaryti dvi frakcijos. Vienos frakcijos tankis toks pats, kaip po pirmosios sintezės – vėl vienoje grandinėje yra ^{15}N, antroje ^{14}N. Kitos frakcijos (dar mažesnio tankio) abiejose DNR grandinėse turėtų būti ^{14}N. Taip iš tikrųjų ir gauta.

DNR ultracentrifuguojama ne tik CsCl, bet ir sacharozės gradiente. Frakcijos padaromos matomomis ultravioletiniais spinduliais arba dažant, dažniausiai etidžio bromidu.

2.4.2. DNR replikacijos eiga

Pateikta 2.4.1 poskyrio pradžioje replikacijos schema labai supaprastinta. Taip supaprastintai DNR replikacija pradžioje įsivaizduota. Manyta, kad užtenka tik surasti fermentą, kuris jungia nukleotidus (nukleozidtrifosfatus) į polinukleotidinę grandinę, ir DNR replikacijos problema bus išspręsta.

1956 m. Kornbergas (A. Kornberg) išskyrė pirmąją *E. coli* DNR I polimerazę. Dabar bakterijų jau žinomos trys (o gal ir 4), eukariotų – keletas DNR polimerazių. Mat vis dar atrandamos naujos DNR

polimerazės. Tačiau giliau ištyrus DNR sintezę ir *dna* mutantus, įrodyta, kad DNR replikacija vyksta labai sudėtingai. Primename (žr. sk. 1.4), kad *dna* mutantai slopina DNR sintezę. Jie aptinkami ir tiriami kaip santykinai letalūs – temperatūriniai mutantai. Kiekvienas naujas nealelinis *dna* mutantas – tai vis naujas genas, naujas veikėjas DNR įvykių grandinėje. *E. coli* yra per 150.

Pagal tris nealelines mutacijas *polA, polB, polC* pavyko išaiškinti, kad *E. coli* yra ir trys DNR polimerazės. Be to, viena iš jų – DNR III polimerazė yra holofermentas, kuris turi mažiausiai 10 komponentų, ir jų sintezę lemia, matyt, 7 genai. Mutacijų *polA, polB, polC* tyrimais taip pat įrodyta, kad retkarčiais viena DNR polimerazė gali pakeisti kitą, stipriai pažeistą.

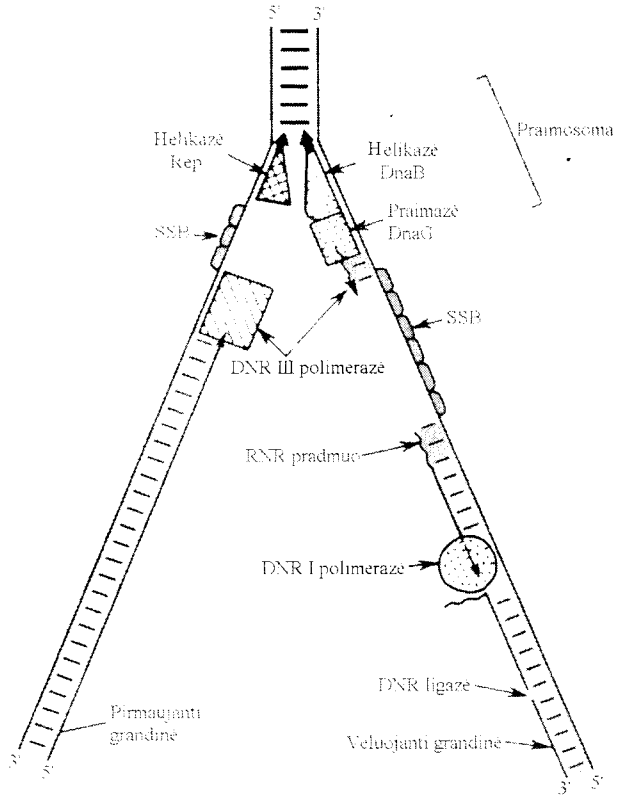
Kitais *dna* mutantais išaiškinta **praimosoma**. Tik vienas iš šios grupės genų, būtent *dnaG*, koduoja **praimazę**. Nemažai aptikta ir *dna* genų, kurių produktai šiandien nežinomi, bet žinios apie jų buvimą skatina ieškoti produktų ir procesų, kuriuos šie genai lemia. Vadinasi, mūsų žinios apie DNR replikaciją dar negalutinės. Ypač mažai žinoma apie *dna* ir kitų genų, dalyvaujančių DNR biosintezėje, valdymą. Labai svarbu išsiaiškinti, kaip valdoma asinchroniška eukariotų įvairių replikonų replikacija ir kaip DNR sintezė suderinta su ląstelės ciklu.

DNR replikacijos tipai ir etapai. Skiriami du DNR sintezės tipai: replikacinė, neplaninė.

Replikacinė sintezė – tai „planinė" viso genomo DNR sintezė. Ji vyksta prieš ląstelei dalijantis. Tai esminė genetinės medžiagos paveldėjimo dalis. Antras svarbus etapas – tiksliai paskirstyti DNR molekules tarp dukterinių ląstelių. Tiek bakterijų, tiek eukariotų replikacinę DNR sintezę atlieka baltymų kompleksas **replisoma.** Suprantama, kad esmingiausi fermentai šiame komplekse yra DNR polimerazės.

Eukariotų mitochondrijos ir augalų plastidės yra santykinai genetiškai savarankiškos: ne tik turi DNR, bet ir autonomiškai sintetina baltymus (žr. p. 231). Jų genomo DNR replikacijai yra specifinės DNR polimerazės, atitinkamai γ ir δ. Specifines DNR polimerazes turi ir kai kurie DNR virusai (pvz., bakteriofagas T_4, pūslelinės virusas). Ir pagaliau ypač specifinę DNR polimerazę turi kai kurie judrieji eukariotų genomo elementai (retrotranspozonai) ir retrovirusai. Tai **atvirkštinė transkriptazė**, arba nuo RNR priklausanti DNR polimerazė. Ji sintetina DNR nuo RNR matricos.

Neplaninė DNR sintezė nesusijusi su ląstelės dalijimusi (iš čia jos pavadinimas), yra ne viso genomo, o tik atskirų DNR segmentų. Žinoma keletas tokios DNR sintezės atvejų. Pirmiausia tokiu būdu užtaisomi DNR vienagrandžiai trūkiai, atsiradę ne tik dėl mutagenių veiksnių (reparacinė DNR sintezė). Trūkiai atsiranda bei užtaisomi ir normaliuose ląstelėje vykstančiuose procesuose, kuriuose dalyvauja DNR. Visais šiais atvejais veikia vienas fermentas: prokariotų – DNR I polimerazė, eukariotų – DNR β-polimerazė.



2.17 pav. **DNR replikacija**

Neplaninė DNR sintezė yra ir tada, kai specialiai padauginama tik dalis genomo, o kartais tik pavieniai genai – vyksta **amplifikacija.**

Dar du neplaninės DNR sintezės tipai aptikti per pirmąjį mejozės dalijimąsi – zigotenoje ir pachitenoje (žr. p. 569). DNR segmentai, kurių replikacija vyksta minėtose mejozės stadijose, atitinkamai vadinami **zyDNR (zigoteninė)** ir **pDNR (pachiteninė).**

DNR replikacijos eiga (2.17 pav). Smulkiau DNR sintezė nagrinėjama „Molekulinės biologijos (genetikos)" kursuose ir B. Juodkos vadovėlyje „Nukleino rūgščių chemijos ir biochemijos pagrindai"

(1988). DNR sintezė prasideda nuo nukleotidų sekos – replikatoriaus, arba ***ori*** (angl. *origin* – pradžia). Šią nukleotidų seką atpažįsta specialūs baltymai (žr. toliau). Dažniausiai iniciacijos signalas iš abiejų pusių apsuptas nukleotidų sekų, kuriose yra daug A–T porų. Tose vietose kur daug A–T porų, DNR grandinės lengviau atsiskiria viena nuo kitos, nes tarp A ir T yra tik du vandeniliniai ryšiai. Tai palengvina **DNR helikazėms,** arba Rep-baltymams, išvynioti dvigubąją DNR spiralę, kad DNR grandinės išsiskirtų ir taptų matricomis naujai sintetinamoms DNR grandinėms. Vienagrandės DNR dalis stabilizuoja **SSB baltymas**, kuris jungiasi su vienagrande DNR.

DNR grandinių išsiskyrimo vietoje susidaro **replikacinė šakutė** (2.17 pav.). Ji juda DNR sintezės kryptimi, ir vis naujos motininės DNR dalys išvyniojamos. Prieš aprašytus įvykius DNR II topoizomerazė pašalina DNR kilpas, o I topoizomerazė (girazė) keičia superspiralizacijos pobūdį: iš „+“ (plius) vijų susidaro „–“ (minus) vijos.

DNR sintezė vyksta viena kryptimi: 5′→3′. Vienoje, **pirmaujančioje** (arba lyderinėje) grandinėje kaip tik ir yra tokia kryptis. Antrosios grandinės kryptis priešinga: 3′→5′. Ši grandinė vadinama **vėluojančiąja**. Ant jos nauja DNR grandinė sintetinama atskirais, vadinamaisiais **Okazakio fragmentais**. Ant šios grandinės sintezė prasideda nuo to, kad specialus fermentas **praimazė** (o kai kurių organizmų RNR polimerazė) sintetina nedidelius **pradmenis** (angl. *primer*). Šie turi 3′-OH galą, būtiną DNR III (arba α) polimerazei. Vėliau šias atkarpas suskaido nukleazės, ir trūkius užstato **DNR I polimerazė**, kuri atlieka reparacinę DNR sintezę. DNR fragmentus sujungia **ligazės**. Kol kas neaišku, kaip prasideda pirmaujančiosios DNR grandinės iniciacija: ar irgi dalyvauja praimazė, ar pakanka to, kad fermentas, kuris iniciacijos vietoje kerpa DNR grandinę, padaro ir 3′-OH galą, tinkamą DNR polimerazei.

Įvairūs DNR replikacijos būdai. Nors pagrindiniai DNR replikacijos momentai yra bendri visiems organizmams, bet įvairių organizmų DNR replikacija turi savitų bruožų. Tai priklauso nuo DNR sandaros (žiedinė-linijinė, vienagrandė-dvigrandė). Priklauso ir nuo replikatoriaus (žr. toliau) sandaros. Gali būti **vienakryptė**. Prasideda viename replikono gale ir tęsiasi iki kito galo. Replikacinė šakutė yra **Y** pavidalo. Kitais atvejais DNR sintezė yra **dvikryptė**. Tokių replikonų *ori* seka yra padvigubėjusi, ir abi kopijos nukreiptos priešingomis kryptimis.

Kai DNR yra žiedinė (bakterijų, plazmidžių, didelio skaičiaus virusų ir kt.), vykstant replikacijai, gali susidaryti graikų abėcėlės teta (θ) raidės pavidalo figūra – **teta kilpa**.

Dar vienas yra „**besisukančio žiedo**“ sintezės būdas. Šiuo būdu vyksta DNR amplifikacija (žr. p. 208). DNR segmentas (su atitinkamais genais) daug kartų padauginamas. Žiedinės DNR viena grandinė įkerpama, ir nuo jos 3′-galo prasideda naujos grandinės sintezė. Antroji grandinė, visą laiką vyniodamasi, panaudojama kaip matrica.

Labai sudėtinga yra žinduolių mitochondrijų DNR replikacija: nuo tam tikro momento ant vienos ir antros žiedinių DNR molekulių grandinių replikacija vyksta atskirai, žiedai atskiriami.

Replikonas. Tai yra genomo dalis, sugebanti savarankiškai sintetintis.

Eukariotų tyrimai privertė pripažinti esant replikacijos vienetą – replikoną. Eukariotų DNR sintezė vyksta atskiromis DNR molekulės dalimis. Tokių replikonų skaičius visiškai neatitinka chromosomų skaičiaus. Antai

	replikonų	chromosomų (n)
mielių (*Saccharomyces cerevisiae*)	750	16
Drosophila melanogaster	3500	4
rupūžės (*Xenopus laevis*)	15000	18
pelių (*Mus musculus*)	25000	20
pupų (*Vicia faba*)	35000	6
bakterijų (*Escherichia coli*)	1	1

Taigi aukštesniųjų eukariotų replikonų yra nuo tūkstančių iki dešimčių tūkstančių, o **bakterijų – tik vienas.** Vadinasi, eukariotų genomui būdinga **multireplikoninė sandara**. Be to, jų replikonai gerokai mažesni (plg. *E. coli* 4639 kb, tuo tarpu drozofilos ir mielių vidutiniškai 16 kb, pelių – 150 kb). Bet kur kas svarbiau, kad jų dydis to paties genomo ribose svyruoja daugiau kaip 10 kartų. Ir itin svarbu, kad atskirų replikonų replikacija vyksta nors ir S stadijoje, bet ne vienu metu, asinchroniškai. Tai siejama su chromatino sandara ir genų veiklos valdymu.

Nuo *ori* prasideda DNR sintezė. Joje išskiriami trumpučiai (mielių 11 bp) segmentai, turintys daug A–T porų. Juos atpažįsta replikacijos pradžios baltymai. Jų yra keletas. Antai *E. coli* 245bp ilgio *ori* yra 3 kartus pakartota 13bp seka **GATCTNTTNTTTT** ir 4 kartus 9bp seka **TTATNCANA**. Su jomis sąveikauja baltymas **DnaA** (sąveikos vietoje jo molekulių daug: 20–40), paskui ir kiti baltymai (DnaB, DnaC ir kt., iš viso 6); 13bp sekų vietose atskiriamos DNR grandinės sudaro replikacinę šakutę. O toliau – jau žinomi įvykiai (žr. aukščiau).

Abiejuose replikono galuose, net *E. coli*, irgi yra pabaigos *(ter)* sekos. Kaip minėta, replikatoriaus sekos, mielių dar vadinamos **ARS** (angl. *autonomous replicating sequences* – savarankiškai replikuojančios sekos), labai svarbios DNR molekulių

8. 1313

genetinei autonomijai nustatyti. Jeigu DNR arba jos dalyse aptinkama ARS, tai neabejotinai galima tvirtinti, jog ji yra savarankiška genetinė struktūra.

Visos **savarankiškos citoplazminės genetinės struktūros** (plazmidės, plastidės, mitochondrijos ir kt.) turi tokias sekas. Dažniausiai jų **DNR** yra **žiedinė, unireplikoninė.**

Labai svarbus DNR replikacijos tikslumas. Neištaisytos klaidos, kurios lieka naujai susintetintoje DNR, yra paveldimi pokyčiai – mutacijos. Aukštas mutacijų dažnis dažniausiai priklauso nuo DNR sintezės klaidų.

Pirmiausia DNR replikacijos stabilumą sąlygoja DNR sandaros ypatybės. Be to, vyksta įjungiamų nukleotidų **kontrolė** ir **korekcija**. Manoma, kad įjungiamojo nukleotido kontrolė atliekama du kartus. Vis dėlto klaidingai įjungtų nukleotidų dažnis turėtų būti apie 10^{-4}. Tuo tarpu tikrasis klaidų dažnis būna 10^{-10}–10^{-14}.

Padarytas klaidas ištaiso, pašalina neteisingai įjungtus nukleotidus DNR polimerazės. Jos yra ir 3′→5′ egzonukleazės. Atliekama DNR korekcija. Vienagrandės DNR kompleksas su SSB baltymu sumažina klaidų dažnį 10 kartų.

Vis dėlto klaidingai įjungtų nukleotidų tebelieka. Pirmiausia juos šalina nesuporuotų nukleotidų, paskui ir kitos DNR reparacijos sistemos.

Aptikta mutagenų ir ypač genų mutacijų, kurios padidina klaidingai įjungtų nukleotidų dažnį. Kai kurios mutacijos padidina 50–100 tūkstančių kartų. Dažniausiai slopinamos DNR polimerazių korekcinės savybės ir nesuporuotų nukleotidų reparacija (žr. VII sk.).

DNR modifikacija. Kaip ir RNR transkriptas, DNR po replikacijos gali būti modifikuojama.

Matyt, pagrindinė ir šiuo metu geriausiai ištirta DNR modifikacija yra **metilinimas**. Metilinimo fermentai metilazės (metiltransferazės) yra įvairios, skiriasi pagal metilinamus nukleotidus (m6A, m5C, m4C) ir pagal atpažįstamas sekas, pvz.:

seka G $\boxed{^{m}A}$TC – metilina Dam-metilazė

seka C $\boxed{^{m}C}\begin{matrix}T\\A\end{matrix}$GG – metilina Dcm-metilazė

Aukštesniuosiuose augaluose ir stuburiniuose gyvūnuose yra aptiktos tik m5C metiltransferazės. Jų genome dažniausiai metilinamos

CG sankaupos (120–2000 kb) – „CG salelės“. Jos sudaro apie 2% žinduolių genomo ir dažniausiai yra geno 5′ dalyje.

Tačiau ne visų organizmų DNR metilinama. Metilintos DNR neaptikta, pvz., drozofilos ir mielių genome.

Metilinimas yra labai svarbi DNR modifikacija. Nuo jos priklauso keletas svarbių genetinių reiškinių. Iš jų pagrindiniai – **genomo imprintingas ir apsauga, chromatino sandara, ląstelės ciklo ir genų veiklos valdymas**. Jie bus nagrinėjami atskirai.

2.4.3. DNR molekulinė hibridizacija, molekuliniai zondai ir polimerizacinė grandininė reakcija

DNR replikacijos ir grandinių išskyrimo pagrindu sukurti svarbūs DNR genetinės struktūros tyrimo metodai.

DNR lydymasis ir molekulinė hibridizacija. Dėl silpnų vandenilinių ryšių DNR grandinės gali atsiskirti viena nuo kitos. Ir tai atlieka ne tik fermentai. Dar 1960 m. buvo nustatyta, kad, laipsniškai keliant temperatūrą, DNR grandinės išsiskiria. Tai vadinama **DNR lydymusi**. Lydymosi temperatūra priklauso nuo nukleotidų G–C ir A–T porų santykio. Kuo daugiau G–C porų, tuo ji aukštesnė. Taigi lydymosi temperatūra gali būti vienas iš DNR sandaros rodiklių.

Laipsniškai mažinant temperatūrą, DNR grandinės vėl susijungia. Jungiasi homologinėmis komplementariomis sekomis.

Panašius reiškinius sukelia pH pokyčiai. Šarminėje aplinkoje DNR irgi lydosi.

Visa tai pritaikoma DNR genetinei analizei – homologijai nustatyti. Jungiasi tiek atskirų genų – nukleotidų sekų, tiek viso genomo DNR segmentai, kurie yra homologiniai (tapatūs). Heterogeniniai DNR segmentai lieka nesusijungę.

Net gana tolimi organizmai gali turėti homologinių DNR segmentų. Kuo labiau lyginamosiose rūšyse DNR yra homologinės, tuo tos rūšys artimesnės, ir atvirkščiai, kuo labiau DNR yra heterogeninės, tuo organizmai vienas nuo kito labiau nutolę. Vaizdumo dėlei galima palyginti žmogaus ir primatų DNR: žmogaus DNR nuo šimpanzės DNR skiriasi tik 1,5–2,5%, šiek tiek daugiau skiriasi nuo gorilos, o nuo pusbeždžionių daugiau kaip 10%.

Molekulinės hibridizacijos metodu tiriami genas ir genomas, nustatoma artimų ir nutolusių taksonominių vienetų sistematika, jų taksonominė padėtis, evoliucija ir kt. DNR grandinių išskyrimas bei sujungimas dar vadinamas **denatūracija** bei **renatūracija**.

Šiuo metu yra veiksmingesnių metodų DNR tirti, bet DNR grandinių išskyrimas ir komplementari sąveika yra daugelio jų esminis dalykas (žr. toliau).

DNR ir RNR molekulinės hibridizacijos metodas ant citologinių preparatų. Atskyrus DNR grandines, galima gauti ne tik „DNR–DNR“, bet ir „DNR–RNR“ hibridus. RNR nukleotidų seka yra komplementari tai DNR atkarpai, ant kurios ši RNR buvo sintetinama, t. y. kuri yra šios RNR genas. Komplementarios DNR ir RNR sekos gali jungtis. Gaunamos hibridinės molekulės, kurių viena grandinė yra iš DNR, kita – iš RNR. 1972 m. tai pavyko atlikti ant citologinių preparatų. Panaudota hemoglobino mRNR, kuri buvo žymėta radioaktyviaisiais izotopais, kad būtų galima nustatyti, kur ši prisijungė prie chromosomos. Konkrečiai ji prisijungė prie vieno šešioliktosios chromosomos ir vieno vienuoliktosios žmogaus chromosomų segmentų. Vadinasi, čia ir yra hemoglobino genai. Pirmasis lokusas nulemia hemoglobino α-polipeptido, o antrasis β-, γ- ir δ-polipeptidų sintezę.

Taigi globino mRNR buvo **zondas** hemoglobino genų vietai nustatyti. Pagal žinomas RNR panašiai nustatoma ir kitų genų vieta chromosomoje. Tačiau, kaip minėta, zondais dažniau naudojama susintetinta arba genų inžinerijos metodais klonuota DNR. Prisiminkime, kad DNR zondo nukleotidų seka gali būti „nužiūrėta“ ir susintetinta nuo konkretaus baltymo aminorūgščių sekos arba klonuota iš taksonomiškai tolimų organizmų.

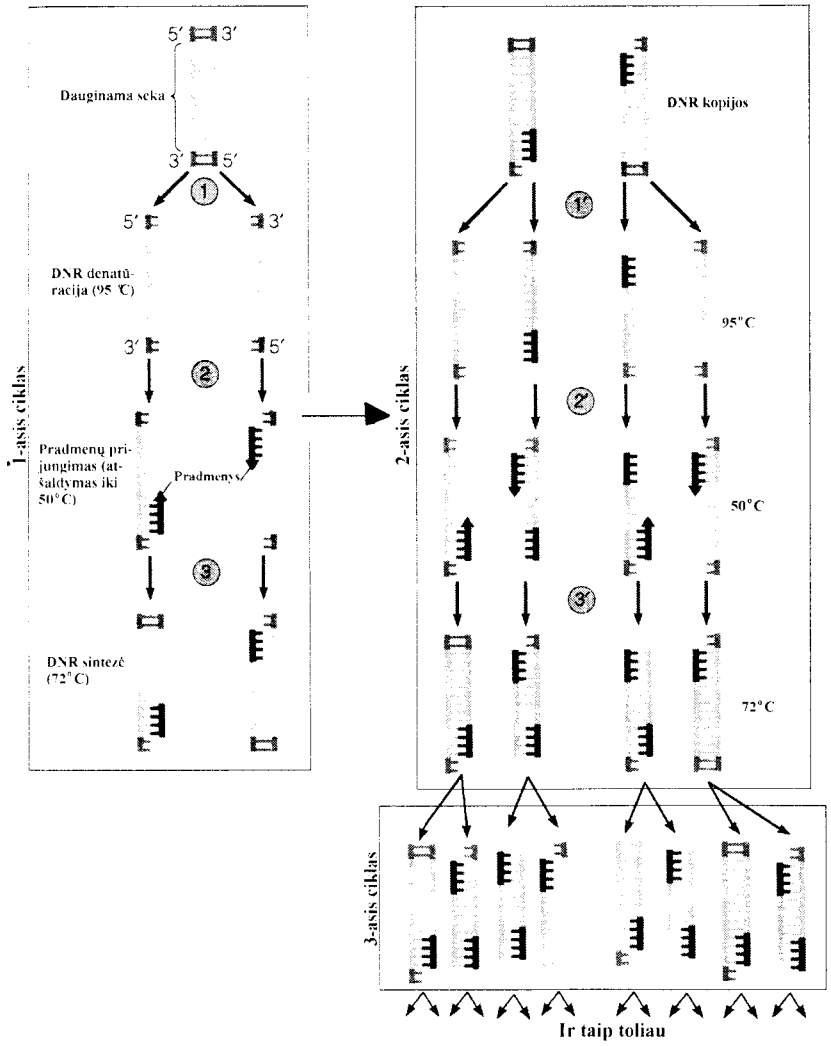
Molekuliniais zondais nustatoma ne tik genų – jų grupių, bet ir konkrečių DNR sekų vieta. Šalia radioaktyviaisiais izotopais žymėtų naudojami ir neradioaktyvieji zondai (žr. 2.4.1).

Molekulinių zondų metodas šiuo metu yra pagrindinis žmogaus chromosomoms genetiškai tirti.

Nustatoma ne tik chromosoma, kurioje yra genas, bet ir geno vieta joje.

Polimerazinė grandininė reakcija (PGR, angl. *PCR*). Naudojantis DNR grandinių išskyrimu aukštoje temperatūroje ir DNR polimerazė (konkrečiai DNR I polimerazės dalimi – vadinamuoju Klenovo fragmentu) izoliuotoje sistemoje (*in vitro*), buvo padauginami DNR fragmentai. Tačiau aukšta temperatūra degraduoja baltymus, todėl po kiekvieno sintezės ciklo reikėdavo vis naujos DNR polimerazės.

1988 m. Miulis (K. Mullis) atrado būdą, kaip norimus DNR fragmentus padauginti neribotą skaičių kartų. Atradimo esmė – neįprasta



2.18 pav. **Polimerazinė grandininė reakcija ir DNR segmento amplifikacija**

DNR polimerazė. Ji išskirta iš bakterijos *Thermus aquaticus*. Ši bakterija gyvena karštuose sieringuose šaltiniuose. Jos DNR polimerazė pavadinta **Taq polimeraze**. Ji pakelia temperatūrą iki 95°C. Optimali temperatūra 72°C, todėl sintezė vyksta tol, kol sunaudojami nukleotidtrifosfatai ir pradmenys. Sintezei būtini pradmenys, kurie riboja dauginamąjį DNR fragmentą iš abiejų galų (2.18 pav.).

DNR paveikiama 95°C temperatūra, kad būtų galima atskirti DNR grandines. Po to, sumažinus temperatūrą iki 50°C, prijungiami pradmenys. Temperatūra pakeliama iki 72°C, ir Taq polimerazė prijungia nukleotidus prie pradmens 3′ galo. Ciklas vis kartojasi. Po 25 ciklų būtų 4 x 10^6 kopijų.

Šiuo metodu padauginus DNR, galima nustatyti ne tik genus, bet ir nedidelius alelinius jų skirtumus, nukleotidų sekų pokyčius dėl mutacijų. Dėl šios priežasties PGR naudojama kaip „pirštų atspaudų" metodas heterozigotinius asmenis pagal mutantinį geną nustatyti, kriminalistikoje, paleontologijoje ir archeologijoje – visur, kur reikia genetiškai identifikuoti asmenį. Galima manipuliuoti seniai mirusių organizmų genomais ir genais. Iš pradžių pakanka labai nedidelio DNR kiekio – gabalėlio odos, lašelio kraujo...

III. GENOMO SANDARA IR VEIKLA

3.1. Prokariotai ir eukariotai. Genomo evoliucija

Eukariotų ir prokariotų samprata. Istoriškai organizmų skirstymas į **eukariotus** (tikrabranduolius, gr. *eu* – tikras + *karyon* – branduolys) ir **prokariotus** (probranduolius, gr. *pro* – prieš+*karyon*; pro – reiškia ankstesnę gyvybės formą) atsirado pagal tai, kad pirmieji turi **branduolį,** o antrieji jo neturi. Pastarieji turi **nukleoidą.** Jis yra eukariotų branduolio ekvivalentas, tačiau nėra apsuptas membranos. Nukleoidas yra kompaktiška masė iš DNR, RNR ir baltymų.

Eukariotai labai skiriasi nuo prokariotų, ne vien branduoliu (3.1 lentelė). Kuo skiriasi jų genų struktūra ir veikla (genetinis kodas, transkripcija, transkripto brendimas, transliacija), išnagrinėta II skyriuje. Kiti skirtumai bus smulkiau nagrinėjami toliau.

Prokariotai skirstomi į **eubakterijas** ir **archebakterijas**, o eubakterijos savo ruožtu – į **bakterijas** ir **cianobakterijas** (anksčiau vadintas melsvadumbliais). Pastarosios vykdo fotosintezę.

Eubakterijų ir archebakterijų genomo sandara taip pat labai skiriasi. Tuo buvo galima įsitikinti iš paskirų nuotrupų II skyriuje. Antai archebakterijų genai yra egzoninės-introninės sandaros. Net manoma, kad eubakterijų genai evoliucijos eigoje intronus prarado. **Archebakterijos** gyvena išties neįprastomis sąlygomis: labai rūgščioje terpėje (pH<2) ir aukštoje temperatūroje (80°C) – **termoacidofilinės;** didelėje druskų koncentracijoje (NaCl daugiau kaip 5,5 M) – **halofilinės;** gali paversti CO_2 metanu (CH_4) ir taip kaupti energiją – **metanogeninės** ir kt. Visa tai yra paveldimos šių bakterijų savybės. Jos įtvirtintos atitinkamuose genuose ir genomo sandaroje. Antai, kaip minėta, archebakterijos *Thermus aquaticus* DNR polimerazės genas koduoja tokį fermentą, kuris nedegraduoja net 95°C, o optimaliausias jo aktyvumas yra 72°C temperatūroje.

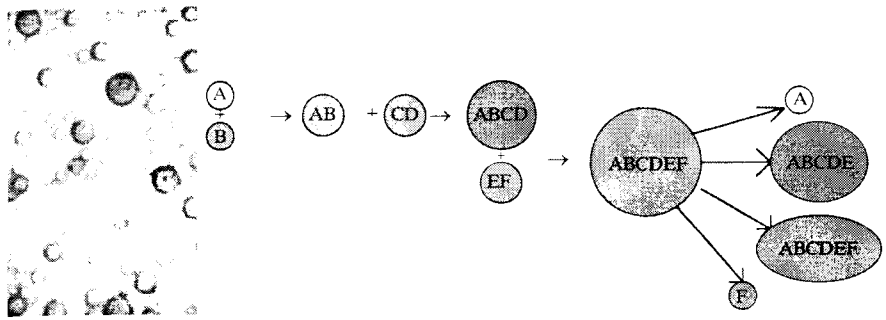
Eukariotai irgi yra labai įvairūs. Labiausiai skiriasi **žemesniųjų** (grybų, dumblių, pirmuonių) ir **aukštesniųjų** (visi kiti) **eukariotų** genomo sandara.

Funkcinės genomo ypatybės, prokariotų ir eukariotų skirtumai geriau suvokiami įsivaizduojant, kaip vyko pirminių ląstelių ir jų genomo evoliucija.

3.1 lentelė. **Prokariotų ir eukariotų ląstelės ir genetinių struktūrų skirtumai**

Savybės	Prokariotai	Eukariotai
I. Bendra organizmo sandara:	Vienaląsčiai	Nuo vienaląsčių iki sudėtingų daugialąsčių
– raida	Paprasta – vienos ląstelės ribose, sudėtingesnė sporifikacija	Labai sudėtinga, daugialąsčių – į specializuotas ląsteles, audinius, organus, laikinas paveldimumas
II. Ląstelės sandara: – *organoidai* (ląstelės kompartmentizacija)	Ne	Taip
tarp jų branduolys, ribojamas dvigubos membranos	Ne, bet DNR sutelkta į nukleoidą	Taip
– ląstelės dalijimasis	Dalijasi skersai persismaugiant	Mitozė, mejozė
III. Genetinė sandara:		
1. Genomo sandara – *vientisumas*	Viena chromosoma, dažniausiai žiedinė	Fragmentacija į chromosomas – linijinės struktūras
– kompleksas su baltymais	DNR kompleksas su ribotu baltymų skaičiumi	Nukleosominė chromosomos sandara
– ploidiškumas	Atitinka haploidą	Haplonto/diplonto kaita, aukštesniųjų eukariotų vyrauja diplontas
– DNR replikacija	Unireplikoninė	Multireplikoninė
– DNR kopijų pasiskirstymas	Primityvus, ant ląstelės membranos	Sudėtingas: mitozė, mejozė
– genų unikalumas	Unikalūs genai, tik rRNR ir tRNR genai yra kartotiniai	Unikalūs ir kartotiniai genai
– judrieji genomo elementai	Transpozonai, insercinės sekos	Didesnė įvairovė
– kartotinės sekos	Mažai	Įvairių tipų ir labai dažnos
2. Nebranduolinės/nechromosominės genetinės struktūros	Plazmidės	Mitochondrijų, plastidžių, kinetosomų DNR, plazmidės (?), kt. (?)
3. Genomo pertvarka	Ribota (Tn, Is, amplifikacija)	Labai įvairi, skirtinga įvairių genomų ir ląstelių
4. Genų sandara ir valdymas:		
– sandara, pertraukti genai (egzonai /intronai)	Tik archebakterijų	Taip, bet ne visų genų
– valdymas	Paprastesnis	Daugumos eukariotų ir daugumos jų genų labai sudėtingas
5. Genetinė rekombinacija:		
– homologinė	Transformacija, transdukcija, bakterijų rekombinacija, seksdukcija	Krosingoveris, geno konversija
– saitspecifinė	Taip	Taip, bet mažesnė reikšmė
dėl atsitiktinio chromosomų derinimosi	Ne	Taip
IV. Paveldėjimas: – *savitumas*	taip, sąlygoja dauginimosi, genomo sandaros ypatumai	
– genų sąveika	Tarp nealelinių genų	Taip, sąlygoja heterozigotiškumas, chromosomų skaičius
– sankibos grupės	Viena	Kiek chromosomų haploidiniame rinkinyje
– nepriklausomas požymių paveldėjimas	Visi genai sukibę	Kai (a) genai nehomologinėse chromosomose, (b) didelis atstumas tarp genų

Ląstelės evoliucija. Suprantama, kad pirminių ląstelių likučių paleontologai neranda ir neras, todėl mokslininkams reikia pirmuosius gyvybės raidos etapus atkurti. Pirmasis etapas šiame kelyje – organinių junginių, ypač biopolimerų sintezė. Taigi pirmiausia reikėjo įrodyti, kad



3.1 pav. **Kairėje – dirbtiniai koacervatai su DNR; dešinėje – įsivaizduojamas koacervatų susiliejimas ir skilimas pasiekus kritinę masę į daugelį fragmentų**

šie junginiai galėjo atsirasti prebiotinėmis sąlygomis, pvz., veikiant aukštai temperatūrai ir elektros išlydžiams, ultravioletiniams spinduliams. Tai buvo sėkmingai padaryta.

Kompartmentai (uždaros erdvės) – antrasis etapas. Pasak A. Oparino, susidarė pūslelės-**koacervatai** (lot. *coacervatus* – surinktas, sukauptas) ir juos supanti pirminė membrana. Kadangi koacervatas – pusiau uždara sistema (3.1 pav.), tai ne visos medžiagos į jį galėjo patekti, bet ir ne visos galėjo iš jo išeiti, ypač polimerai. Taigi santykinai vidinė aplinka įgijo pastovumo.

Koacervatas – tai pirminis kompartmentas, atribota nuo išorinės aplinkos erdvė.

Atsiribojimas membranomis yra vienas paprasčiausių, bet ir klasiškiausių būdų gyvų organizmų **homeostazei** (pastoviai vidinei aplinkai) palaikyti. Palyginimui reikia nurodyti, kad ir dabartinių organizmų atsparumas nebūdingoms, svetimoms medžiagoms, vadinamiesiems **ksenobiotikams** (antibiotikams, pesticidams ir kt.), pirmiausia priklauso nuo nepralaidžių membranų. Tik tuo atveju, kai ši priemonė nepakankama arba neveiksminga (medžiagos yra skvarbios), veikia kiti atsparumo mechanizmai.

Nesunku įsivaizduoti, kaip koacervatai, užgrobdami dalį jų aplinkoje plaukiojančių koloidinių agregatų, virto erdviškai izoliuotų sistemų populiacija. Turėjo vykti gamtinė šių sistemų atranka. Išliko tie, kurie buvo „užgrobę" ką nors vertingesnį. Ir pirmenybė, matyt, buvo

teikiama tiems koacervatams-pūslelėms, kurie turėjo pirminio genomo elementų. Šių pagrindinė paskirtis buvo stabilizuoti pirminės ląstelės sudedamąsias dalis ir vyksmus (tiksliau, jų užuomazgas). Kitaip tariant, pirmenybė buvo teikiama toms pirminėms ląstelėms, kuriose buvo daugiau tvarkos ir pastovumo.

Erdvinio atsiribojimo (kompartmentizacijos) kryptimi itin toli yra pažengusi eukariotų ląstelė. Eukariotų ląstelėse svarbiausios funkcijos sutelktos tam tikruose ląstelės centruose, organoiduose, kurių neturi prokariotai: paveldėjimo, genetinės informacijos saugojimo, reprodukcijos ir transkripcijos į RNR, transkripto brendimo ir kompleksų su baltymais sudarymo – branduolyje, fotosintezės – chloroplastuose, kvėpavimo ir energijos kaupimo (ATP sintezės) – mitochondrijose ir kt. Net to paties organoido viduje gali būti sudėtinga erdvinė sandara. Branduolyje yra tanki plokštelė lamina, branduolėlis(iai), nukleoplazma ir, svarbiausia, chromosomos. Mitochondrijose ir plastidėse, kurios yra iš dviejų membranų, sudėtinga yra vidinė membrana su erdviškai orientuotomis baltymų molekulėmis.

Prokariotų ląstelėse yra tik **kompartmentizacijos užuomazgos**. Antai bakterijų ląstelėse, įdubus plazminei membranai, susidaro **mezosoma**. Ją būtų galima palyginti su pinocitozinėmis eukariotų vakuolėmis, tačiau mezosomos funkcija yra kita – prie jos tvirtinasi bakterijos DNR. Mezosomos paskirtis – taisyklingai paskirstyti DNR molekulės kopijas tarp dukterinių ląstelių. Sudėtinga struktūra yra ir bakterijų žiuželiai. Cianobakterijos vykdo fotosintezę, todėl jų ląstelėse yra fotosintezę vykdančių membranų, būdingų ir eukariotų plastidėms. Vienas organoidas yra bendras prokariotų ir eukariotų ląstelėms. Tai ribosomos. Be to, skirtumai tarp prokariotų ir eukariotų ribosomų yra neesminiai.

Daugialąsčių eukariotų kompartmentizacija labai stipriai vystėsi toliau ir visiškai nauja kryptimi. Iš pradžių atsirado vienodų ląstelių sankaupos – kolonijos. Vėliau vystėsi tikri daugialąsčiai organizmai su specialios paskirties ląstelėmis, audiniais, organais. Įvairūs dumbliai gali būti šio etapo tarpinių grandžių pavyzdžiai. Įdomiausias ir geriausiai šiuo atžvilgiu ištirtas yra gleivūnas *Dictyostelium discoideum* (3.2 pav.). Kaip minėta, šis vienaląstis gleivūnas blogomis sąlygomis virsta daugialąsčiu organizmu. Tokiam virsmui signalą duoda ląstelės, gaminančios

A B C D

3.2 pav. **Gleivūno *Dictyostelium discoideum* virsmas iš vienaląsčio daugialąsčiu organizmu:**
A – vienaląsčiai gleivūnai; *B* – gleivūnų agregacija; *C* – pseudoplazmodžio migracija iš vienos vietos į kitą; *D* – kojelės ir sporų diferenciacija

daug ciklinio adenozinmonofosfato (cAMP). Apie tokias ląsteles būriuojasi kitos ląstelės, rikiuojasi į ilgus vamzdžio pavidalo daugialąsčius kūnus, po to susidaro vaisiakūniai, o ant jų sporos...

Daugialąsčių eukariotų organizme funkcijos paskirstytos erdviškai atribotoms ląstelėms, audiniams, organams.

Paveldėjimo, rekombinogenezės ir mutagenezės reiškiniai tiesiogiai susiję su šio tipo kompartmentizacija. Ypač progresavo būdai apsaugoti, atriboti nuo aplinkos dauginimuisi skirtas ląsteles ir struktūras (gametas, sporas, gemalą ir kt.). Šia kryptimi tarp eukariotų matoma kylanti evoliucija sudėtingumo ir tobulėjimo kryptimi. Iš pradžių daugialąsčių dauginimuisi skirtos ląstelės atsidūrė giliame sluoksnyje (tai matyti dumbliuose). To visiškai pakanka apsisaugoti nuo labai mutageniškų, bet menko skvarbumo ultravioletinių spindulių. Jie lemtingi vienaląsčiams prokariotams, bet mažiau pavojingi daugialąsčiams.

Gyvūnų tobulėjo **kiaušinis**, o augalų – išsivystė **sėkla**. Šios struktūros turi maisto atsargų pradiniam raidos etapui ir apdangalais yra apsaugotos nuo išorės. Gaubtasėklių sėkla – augalų tobulumo viršūnė. Jos gemalo organogenezė toli pažengusi. Ir tai vyksta ant motininio augalo. Dar tobuliau nuo išorinės ir vidinės aplinkos yra apsaugota žinduolių organogenezė. Ji visiškai baigiasi motinos organizme, maksimaliai pastoviomis ir kontroliuojamomis sąlygomis. Tai atlieka placenta, kuri yra kliūtis net mutageniškoms, svetimoms organizmui medžiagoms – ksenobiotikams.

Dauginimosi ir genetinės rekombinacijos užuomazgos koacervatuose. Pūslelės galėjo ir turėjo tiesiog mechaniškai viena su kita susilieti. Taip vienos ir kitos turinys tapo bendru „turtu", teigiamos savybės irgi bendros. Tai bendras visų genetinės rekombinacijos tipų principas. Antra vertus, tokie pūslelių susiliejimai turėjo ribas. Turėjo būti pasiekiama tokia koacervato kritinė masė, kuriai esant šis tapdavo nepatvarus, subyrėdavo. Tai jau pirminė ląstelių **dalijimosi užuomazga.** Kadangi koacervato turinys fragmentuose pasiskirstydavo atsitiktinai, jie būdavo nevienodai „turtingi". Tačiau bent dalyje jų turėjo išlikti per susiliejimus įgytas bendras „turtas"– sudėtis, sandara (3.1 pav.). Štai ir **paveldėjimo užuomazga**. Atranka tobulino pradines ląsteles. Išliko tik tobulesnės, todėl „susimesti į krūvą" tapo naudinga. Tokį įvykį turėjo įteisinti atranka.

Šiuolaikinių ląstelių pirmas ir vienas pagrindinių signalų dalytis yra kritinė ląstelės masė (žr. p. 335). Augimui/ląstelės dalijimuisi reikia medžiagų ir energijos. Tik jas sukaupus ima veikti kiti ląstelių dalijimosi signalai.

Genomo evoliucija. Kaip formavosi genomas ir labai sudėtinga baltymų sintezės sistema, iki šiol tebėra mįslė. Net patys primityviausi vienaląsčiai organizmai turi ribosomas. Tačiau pagrįstai manoma, kad **pirminė genetinė medžiaga buvo ribonukleorūgštis**. Ir šiuo metu RNR kaip genetinė medžiaga nėra visiškai išstumta. Tai daugumos augalų virusų, kelių bakterijų virusų, maždaug pusės žinduolių virusų, kai kurių plazmidžių, viroidų, epigenų genetinė medžiaga.

Pirminėse ląstelėse genetinė medžiaga buvo RNR, matyt, dėl kelių priežasčių. DNR veiklai reikalingas tarpininkas, todėl iš pradžių buvo paprastesnė baltymų sintezės sistema, be tarpininko; RNR tiesiogiai dalyvavo sintezėje kaip matrica. Labai svarbu tai, kad RNR galėjo veikti kaip autokatalizatorius. Ir šiuolaikiniuose organizmuose transkripto brendimą, kai kuriuos transliacijos procesus katalizuoja ribozimai (RNR, žr. 2.3–2.4). Manoma, kad polipeptidai iš pradžių stabilizavo RNR struktūrą ir tik vėliau nurungė RNR kaip geresni biokatalizatoriai.

Taip pat manoma, kad pirminėse RNR, kurių sintezė vyko abiotinėmis sąlygomis, nukleotidai atsitiktinai jungėsi į polinukleotidinę grandinę. Turėjo vykti šių molekulių atranka, tačiau bendra visų vienagrandžių nukleorūgščių tendencija sudaryti antrą grandinę komplementarumo principu buvo pamatas matricinei sintezei – **replikacijai** atsirasti.

Netikėtai pastaruoju metu pradėjo aiškėti detalės, kaip ilgų išbandymų (atrankos) būdu kūrėsi santykiai tarp DNR ir RNR arba tarp DNR ir kitų junginių, t. y. kaip kūrėsi **genetinė sistema**. Antai imituojant atranką (iš 10^{13} DNR variantų!) pavyko atrinkti DNR molekules, sąveikaujančias su neįprastais junginiais: trombinu, organiniais dažais ir kt., su kuriais anksčiau DNR nesąveikavo. Jau dabar šis atradimas pritaikytas kuriant neradioaktyviojo DNR žymėjimo metodus, vaistų pramonėje. Atrankos būdu pakeisti ir kiti makromolekulių sąveikos parametrai. Antai mažo *E. coli* RNR viruso Q_β replikacijos laikas sutrumpintas net 15 kartų. 83% sutrumpėjo ir viruso genomas. Ribozimas iš *Tetrahymena termophila* pradėjo karpyti ir susiūti DNR. Paprastai šis ribozimas vykdo splaisingą, vadinasi, karpo ir susiuva RNR. Taigi atskleistas dar vienas labai svarbus genomo evoliucijos momentas: kaip į genetinės medžiagos veiklos sferą įeinantys veiksniai „keitė šeimininką", kai RNR kaip genetinę medžiagą nukonkuravo DNR.

DNR – genetinė medžiaga. Dvigrandė DNR sandara labai stabili. Tai, matyt, viena iš pagrindinių priežasčių, kodėl evoliucija pasirinko genetine medžiaga DNR. Tačiau ne vien cheminis DNR stabilumas lėmė tai, kad ji išstūmė kaip genetinę medžiagą RNR.

Dvigrandėje DNR slypi galimybės

- DNR replikacijai, tiksliai paskirstyti molekules-kopijas;
- DNR pažaidų reparacijai, ištaisyti pažaidas, naudojantis antrąja nepažeista DNR grandine kaip matrica trūkiui užtaisyti.

DNR pažaidų reparacijos atsiradimas. Mutageniškų ir pražūtingų veiksnių pirminėje terpėje gyvybei tarpti turėjo būti itin apstu. Pvz., tuo metu labai agresyvus mutagenas turėjo būti ultravioletiniai spinduliai (UV). Mat ozono apvalkalas, ekranuojantis, sulaikantis UV, susidarė vėliau dėl augalų vykdomos fotosintezės ir išskiriamo deguonies. Taip pat vyko intensyvios cheminės sąveikos, pvz., nukleotidų alkilinimas. Taigi tiesiog būtinai turėjo kurtis sistemos, apsaugančios pirminę genetinę medžiagą nuo skvarbių mutageniškų veiksnių. Vienaląsčiams tai itin aktualu. DNR reparacijos sistemų evoliucija yra pasiekusi viršūnę jau prokariotuose. Tačiau ir šios šiuolaikinės DNR reparacijos sistemos gana sudėtingos. Iš pradžių turėjo būti nesudėtingas DNR reparacijos tipas. Viena dažniausių DNR pažaidų

yra **vienagrandžiai DNR trūkiai**, kurie atsiranda kaip daugelio pirminių RNR ir DNR pažaidų pasekmė. Vienagrandėms nukleorūgštims tokie trūkiai būtų fatališki. Todėl, pirma, atranka turėjo teikti pirmenybę dvigrandėms nukleorūgštims. Antra, dvigrandė nukleorūgščių sandara savaime lėmė paprasčiausią DNR reparacijos būdą – **užtaisyti trūkį naudojantis antrąja grandine kaip matrica**.

Diploido genetinė medžiaga yra dar saugesnė. Degradavus vienai DNR molekulei, išlieka antra. Šiuo atžvilgiu dar pranašesni yra **poliploidai**, kurie turi didesnį kaip 2 chromosomų rinkinių skaičių. Neatsitiktinai tuose Žemės rajonuose, kuriuose sunkios ekologinės sąlygos, augalų poliploidinės rūšys yra dažnos. Gyvūnų, ypač **žinduolių optimalus chromosomų skaičius yra diploidinis**, taigi žinduolių poliploidai negyvybingi. Didesnį chromosomų rinkinių skaičių sunkiau tiksliai paskirstyti dukterinėms ląstelėms, pažeidžiamas genų balansas. Tačiau somatinės ląstelės gana dažnai yra poliploidinės, ypač tų organų, kurių veikla susijusi su mutageniniais veiksniais, kaip antai kepenų.

Yra dar viena priežastis, kodėl diploidų DNR saugesnė. DNR trūkiai gali būti užtaisomi ir naudojant kaip matricą antrąją DNR molekulę. Tokiu būdu pašalinami netgi dvigrandžiai DNR trūkiai, kurie, jų nepašalinus, yra mirtini ląstelei.

3.2. Bendras genomo sandaros apibūdinimas

Bendram genetinių struktūrų apibūdinimui vartojamos dvi sąvokos:

- **genotipas** (beveik išimtinai tik eukariotų) – genetinių organizmo ypatybių visuma;
- **genomas** – klasikiniu atveju (vėlgi eukariotų) genų visuma haploidiniame chromosomų rinkinyje; platesne prasme – genų visuma chromosomose; arba genų visuma konkrečioje genetinėje struktūroje:
  - bakterijų (virusų) genomas – genų visuma dažniausiai žiedinėje DNR (arba RNR);
  - konkrečių nebranduolinių genetinių struktūrų genomai (mitochondrijų, chloroplastų, plazmidžių ir kt.) – genų visuma šių struktūrų DNR (arba RNR).

Genomas/genotipas yra ilgametės atrankos subtiliai **subalansuota genų visuma**. Tuo įsitikinta tiriant tris tokius esminius genetinius reiškinius kaip genų sąveika, genų grupės, genų veiklos valdymas. Visi šie reiškiniai nagrinėjami atskirai. Genų/chromosomų balansas gali lemti požymius (pvz., drozofilos lytį). **Genų balansas** yra **vienas iš genų valdymo reiškinių** (pvz., genų, kurie yra X chromosomoje). Sutrikus genų/chromosomų balansui, gali atsirasti mutacijos.

Genomų dydis, išreikštas bazių poromis (bp), svyruoja labai didelėse ribose – nuo $5x10^3$ bp viruso SV 40 iki 10^{11} bp augalo *Trillium*.

Štai kai kurių genetinių objektų genomai (bp):

- virusas – bakteriofagas T_2 – $1,6x10^5$
- bakterija *Escherichia coli* – $4,2–4,7x10^6$
- mielės *Saccharomyces cerevisiae* – $1,4–2x10^7$
- nematodas *Caenorhabditis elegans* – $8x10^7–1x10^8$
- vaisinė muselė *Drosophila melanogaster* – $1,4–1,7x10^8$
- rupūžė *Xenopus laevis* – $3,1x10^9$
- vairenis (augalas) *Arabidopsis thaliana* – $7x10^7$
- žirnis *Pisum sativum* – $5x10^9$
- žmogus *Homo sapiens* – $3,3x10^9$

Genomo dydis turėtų būti proporcingas dviem vienas su kitu susijusiems dalykams:

- **genetinės informacijos kiekiui**, kurį koduoja konkretus genomas;
- **evoliucijos lygiui.**

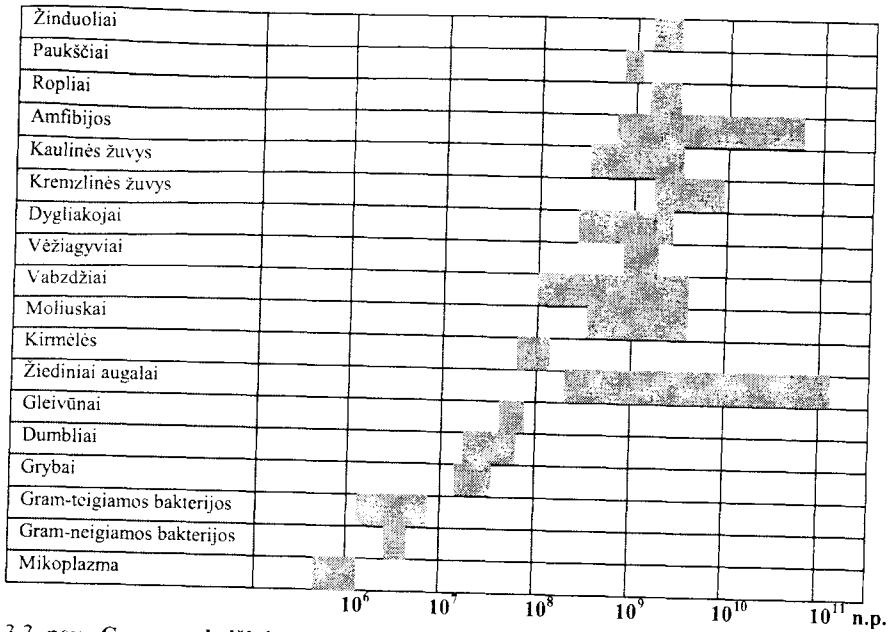
Apskritai taip ir yra (3.3 pav.). Tačiau yra ir akis badančių neatitikimų. Ypač stebina labai dideli aukštesniųjų augalų ir amfibijų genomai. Be to, jų dydis svyruoja labai didelėse ribose. Įvairių žinduolių genomų dydis palyginti nedaug skiriasi.

Pagrindinės genomo tyrimo kryptys ir metodai yra tokie:

- nustatyti genų seką ir vietą chromosomose;
- nustatyti nukleotidų sekas – sekvenuoti, išaiškinti jų funkcinę reikšmę ir ypatybes;
- klonuoti ir tirti genus.

Genomo tyrimo metodai bus nagrinėjami atskirai. Jie visą laiką tobulinami.

Kai kurie genomai tiriami totaliai – sekvenuojamas visas geno-



3.3 pav. **Genomo dydžiai nukleotidų poromis (n.p.)**

mas, išaiškinami visi genai. Pirmasis sekvenuotas genomas buvo smulkaus, vienagrandžio fago ϕX174 (tik 5375 bp), toliau sekvenuoti kelių kitų virusų, žmogaus ir kitų organizmų mitochondrijų genomai (žmogaus mitochondrijų DNR apie 16 kb). Eukariotų baigti sekvenuoti *Saccharomyces cerevisiae* ir *Caenorhabditis elegans* genomai ir baigiama sekvenuoti drozofilos genomą. Iki 1997 m. pabaigos visiškai sekvenuoti 13 bakterijų ir mielių genomų.

Pagrindinis dėmesys sutelktas į žmogų. 1990 m. priimtas tarptautinis „Žmogaus genomo projektas". Pradėjus vykdyti šį projektą, 1990 m. žmogaus genome buvo nustatyti 1772 genai, o 1996 m. jų jau buvo 3868, t. y. dvigubai daugiau. 1996 m. kas dieną buvo sekvenuojama apie 1 mln. nukleotidų, tuo tarpu pradėjus projektą tai buvo visų metų įtempto darbo rezultatas. 1999 metai baigėsi sensacija: visiškai sekvenuota pirmoji žmogaus chromosoma, o 2000 m. balandyje – visas žmogaus genomas.

Genų skaičius ir dydis. Normalu, kad kiekvienos organizmų grupės genomuose yra netranskribuojamosios DNR sekos. Kaip jau minėta II skyriuje, jos būtinos genų veiklai valdyti. Tačiau eukariotų genome stebina genomo dydžio ir genų skaičiaus neatitikimas.

Antai žmogaus genome koduojančiosios DNR sekos sudaro tik 3%. Buvo metas, kai manyta, kad žmogaus genome yra 3–6 mln. genų, bet tuo metu nieko nežinota apie genų reguliacinę dalį ir kitas netranskribuojamąsias genomo dalis, intronus. Vėliau manyta, kad žmogaus genome yra tik apie 50000 genų. Šiuo metu šis skaičius padvigubintas – jau 100000 genų. Nematodo *Caenorhabditis elegans* genų skaičius „padidėjo" nuo 3000 iki 20000 genų. Tai bendra tendencija. Ji priklauso nuo genomo ištirtumo ir nuo to, kokios nukleotidų sekos priskiriamos genui, pagaliau ir nuo konkrečių genų dydžio. Įvairūs genai yra nevienodo dydžio. Pasitaiko genų, kurie savo dydžiu griauna bet kokius skaičiavimus. Antai žmogaus genome stambiausias yra Diušeno raumenų distrofijos genas. Jo transkribuojamoji dalis yra apie 2000 kb. Tai priklauso ne tik nuo neįprastai didelės 14 kb dydžio mRNR, bet ir nuo daugiau kaip 60 intronų.

Eukariotų **geno dydis** evoliucionavo daugiausia reguliacinės geno dalies ir intronų sąskaita.

Palyginimui vidutinis geno dydis:
- grybų – 1,5–1,6 kb,
- *Caenorhabditis elegans* – 4,0 kb,
- drozofilos – 11,3 kb,
- žinduolių – 16,6 kb.

Genomų/genų homologija. Suprantama, kad tarp giminingų rūšių yra didesnė genomo homologija, tapatumas. Tačiau ir nutolusiuose taksonuose yra homologinių genų. Pirmasis tai netiesiogiai aptiko N. Vavilovas. Tyrinėdamas augalų kintamumą, jis nustatė, kad genetiškai artimoms augalų ir gyvūnų rūšims, gentims ir net šeimoms būdingas lygiagretus požymių kintamumas. Antai visuose žaliuosiuose augaluose pasitaiko įvairių chlorofilinių mutacijų: augalai visiškai balti (*albina*), geltoni (*xantha*) ir t. t. Albinosų būna ir augalų, ir gyvūnų.

Vavilovas, apibendrindamas savo tyrimų duomenis, 1920 m. suformulavo **homologinių paveldimo kintamumo eilių dėsnį:**

- genetiškai artimų rūšių ir genčių yra toks panašus paveldimas kintamumas, kad, sudarius vienos gerai ištirtų rūšių grupės požymių kintamumo eiles, galima numatyti ir kitų rūšių lygiagrečias formas;
- ištisoms šeimoms būdingas bendras kintamumo ciklas.

Šis dėsnis skatino ieškoti jo priežasčių. Pagaliau buvo nustatyta kai kurių genomų ir genų homologija. Antai iš 19 žmogaus chromosomų 16 yra tokios kaip kačių chomosomos ir tik septyniose žmogaus chromosomose aptikti pastarųjų sandaros pokyčiai, kurių nebuvo kačių chromosomose. Net 72% ryžių genų atitinka kukurūzų genus ir t. t.

Geno vieta chromosomoje. Genai gali būti pavieniai, išbarstyti po genomą ir sutelkti į įvairaus tipo **genų sankaupas (klasterius** – angl. *cluster*), tačiau abiem atvejais jų vieta neatsitiktinė. Pasikeitus genų arba jų sankaupų vietai, keičiasi įvairios genų savybės, pirmiausia genų veikla. Šis reiškinys vadinamas **padėties efektu**.

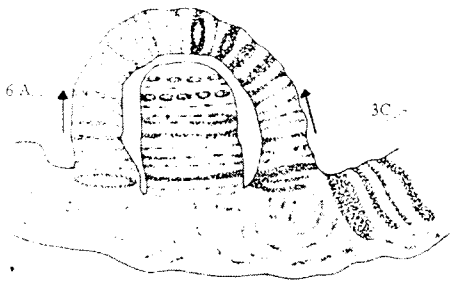
Padėties efektas skirstomas į **stabilųjį (S)** ir **variabilųjį (V).** Stabilųjį ir apskritai padėties efektą 1925 m. išaiškino Startevantas. Jis pastebėjo, kad tas pats drozofilos genas vienaip veikia, kai jo aleliai yra po vieną abiejose **X** chromosomose, ir kitaip, kai po netolygaus krosingoverio abu aleliai atsiduria vienoje **X** chromosomoje, o antroje jų nebūna. Taip atsiranda jau minėta mutacija *Bar*, pastoviai perduodama palikuonims.

Variabilųjį padėties efektą 1934 m. kartu su savo bendradarbiais atrado N. Dubininas (todėl kartais padėties efektas vadinamas **Dubinino efektu**). Jis yra laikinas ir susijęs su **heterochromatinu** – stipriau kondensuota chromosomos dalimi (žr. toliau). Genai, esantys heterochromatine arba arti jo, inaktyvinti. Pastebimas poliškumas: kuo arčiau heterochromatino yra genas, tuo silpnesnė jo veikla (3.4 pav.).

Geno padėtis gali turėti įtakos jo veiklai, dominavimo krypčiai ir mutavimo dažniui. Kartais dėl padėties efekto atsiranda genetinis nestabilumas (žr. p. 525). Prokariotų genai neatsitiktinai išsidėstę genų sankaupose – operonuose (žr. IV sk.).

Unikalieji ir kartotiniai genai. Nurodytas, pvz., žmogaus, genų skaičius genome 100000 yra „vardinis". Mat genome daug genų kartojasi keletą dešimčių, šimtų ar net tūkstančių kartų. Šiuo atžvilgiu genai skirstomi į **unikaliuosius** ir **kartotinius**. Iš bendro genų sąrašo žmogaus unikaliųjų genų, kurie nesikartoja, yra apie 64%, drozofilos – apie 70%. Tai genai, koduojantys tokius fermentus, kurių ląstelei reikia nedaug, todėl pakanka vienos geno matricos.

Vienas iš būdų padidinti geno produkto kiekį yra **kartotiniai genai.**



3.4 pav. **Variabilusis padėties efektas:** drozofilos X chromosomos segmentas $3C_{1-7}$–$6A_{1-2}$ translokuotas į ketvirtos chromosomos heterochromatiną. Genai, kurie yra arčiausiai heterochromatino, iš dalies slopinami (pasireiškia mozaika). Tolstant nuo heterochromatino (kryptis parodyta rodykle), slopinantis heterochromatino poveikis pamažu nyksta; vidurinėje segmento $3C_{1-7}$–$6A_{1-2}$ dalyje genai nestelbiami

Prokariotų genome kartotiniai yra tik rRNR ir tRNR genai. Antai *E. coli* yra 7 kartotinių rRNR (kartu su tRNR) genų sankaupos (žr. toliau). Tuo tarpu eukariotų rRNR genų-sankaupų yra daug, pvz., mielių 140. Aukštesniųjų eukariotų dar daugiau. *Xenopus laevis* yra 450–28/5,8/18S rRNR ir 24000 – 5S rRNR genų. Žmogaus genome tokių genų yra atitinkamai 280 ir 2000.

Kai kuriose specialiosiose eukariotų ląstelėse šių genų skaičius dar labiau padidėja. Vyksta jų **amplifikacija** (lot. *amplificatio* – išplėtimas). Be to, aukštesniųjų eukariotų 28/5,8/18S rRNR ir 5S rRNR genai yra atskirai, tuo tarpu bakterijų ir žemesniųjų eukariotų genome visi rRNR genai yra kartu.

Eukariotų 28/5,8/18S sankaupos, o dažnai ir 5S genai sutelkti į dideles **kartotinių genų sankaupas.** Be to, eukariotų 28/5,8/18S rRNR kartotinių genų sankaupa chromosomoje išsiskiria savo ypatinga sandara: yra antrinėje chromosomos sąsmaukoje ir vadinama **branduolėlio orgnizatoriumi.** Branduolėlis ir yra šių genų veiklos produktas. Čia ne tik sintetinamos rRNR, bet ir susidaro granulės – formuojasi RNP (ribonukleoproteidas).

Eukariotų genome vienas paskui kitą kartojasi ir **histonų genai**. Kartotinėje sankaupoje būna nuo kelių dešimčių iki kelių šimtų histonų genų – sankaupų. Mat ir visus 5 histonus (H1, H2B, H2A, H3, H4) koduojantys genai, kaip ir 28/5,8/18S rRNR genai, yra vienoje vietoje – sudaro sankaupą.

Genų grupės – viena iš bendrųjų genomo sandaros ypatybių. Jos yra labai įvairios. Kai kurios iš jų toliau bus nagrinėjamos konkrečiai. Tačiau visi genai yra organizuoti į vienokio ar kitokio tipo grupes, kurias vienija bendras genų veiklos valdymas. Pagrindinėmis reikia laikyti dvi genų grupes, kurios yra bakterijų genome: **operoną** ir **reguloną.**

Klasikiniu atveju:

- **operonas** yra genų sankaupa, į kurią įeina struktūriniai genai ir bendros valdymo sekos, nuo operono struktūrinių genų transkribuojamas vienas bendras transkriptas;
- **regulonas** yra išsibarsčiusių po genomą genų grupė, kurią vienija bendri šių genų veiklos reguliatoriai.

Trumpai apie genų kilmę (genų evoliucija – atskiras klausimas). Klasiškiausias būdas naujiems genams atsirasti – duplikacijos. Padvigubėję genai turėtų keistis dėl mutacijų ir genetinės rekombinacijos. Kaupsis mutacijos ir vyks padvigubėjusių genų divergencija – vienas klasiškiausių evoliucijos reiškinių, nustatytas Darvino.

Genus gali vienyti ir bendra kilmė, nustatoma pagal jų homologiją. Genų grupė, kilusi dėl duplikacijų ir paveldimojo kintamumo (genų mutacijų, translokacijų, rekombinacijų ir pan.) iš bendro geno-protėvio, vadinama **šeima**. Tas pat taikoma ir įvairioms DNR nukleotidų sekoms (*Alu* šeima, žr. toliau).

Divergencija gali būti labai toli pažengusi, genai – skirtis koduojamąja savybe, požymiu. Taip, pvz., atsitiko imuniteto genams. Jie sudaro labai didelę ląstelės paviršiaus baltymų superšeimą.

Galimas ir priešingas reiškinys. Po daugkartinių duplikacijų atsiradusių kartotinių genų tapatumas specialiai palaikomas pastovus. Taip yra rRNR genams.

Kitas klausimas – **geno vieta**. Po duplikacijos galimi du atvejai. Atsiradę po duplikacijos genai yra likę vienoje vietoje, sudarydami sankaupą. Tačiau žinomas ir kitas, translokacijos reiškinys. Genas arba keletas jų galėjo būti perkelti arba į kitą vietą toje pačioje chromosomoje, arba į kitą chromosomą. Tai jau priklausė nuo **genomo strategijos**. Ar naudingiau, geriau genams veikti sutelktiems vienoje vietoje, ar išbarstytiems po genomą? Ir tos pačios grupės genams (pvz., hemoglobino α ir β, citochromų P-450 ir kt.) gali būti būdingi abu reiškiniai: dalis genų išliko toje pačioje vietoje, kiti perkelti į kitą chromosomą(as).

Kartotinės sekos – eukariotų genomo ypatybė. Nepaisant didelių pastangų, jų paskirtis iki šiol nelabai aiški, nors kartotinių sekų dalis genome aiškiai evoliucionavo. Ji didėja aukštesnėse eukariotų grupėse. Kartotinės sekos yra labai įvairaus dydžio, dažnio ir kilmės. Pagal šias ypatybes šiuo metu jos yra skirstomos į grupes (žr. toliau).

Judrieji genomo elementai (šokinėjantys genai). Juos atrado Maklintok (B. McClintock) kukurūzuose. Manyta, kad tai išimtinis reiškinys. Tačiau judrieji genomo elementai buvo aptikti bakterijų, o vėliau ir kitų organizmų genome ir įsitikinta, kad jie yra viena iš genomo sandaros ypatybių, būdingi visoms organizmų grupėms. Judrieji genomo elementai irgi yra įvairūs (insercinės sekos, transpozonai, retrotranspozonai). Jie skiriasi dydžiu, sandara, kilme ir transpozicijos pobūdžiu. Šie klausimai nagrinėjami atskirai, kaip ir judriųjų genomo elementų reikšmė.

Judrieji genomo elementai yra universalios genetinės struktūros, kurių transpozicija – vienas iš genomo pertvarkos ir gamtinės valdomos mutagenezės būdų.

3.3. Kartotinės sekos

Eukariotų genome gausiai yra nukleotidų kartotinių sekų, kurių paskirtis iki šiol nėra aiški. Tačiau tai išskirtinė eukariotų genomo ypatybė. Jas 1968 m. pirmieji aptiko Britenas (R. Britten) ir Konas (D. Kohne). Aptinkami DNR denatūracijos-renatūracijos, centrifugavimo tankio gradiente, molekulinių zondų metodais. Šiais metodais nustatyti du svarbūs faktai.

1. DNR kartotinių sekų dalis eukariotų genome evoliucionavo gausumo kryptimi.

- Prokariotai turi tik nekartotinę DNR, o rRNR ir tRNR genai yra kartotiniai.
- Žemesniųjų eukariotų genome vyrauja nekartotinė DNR, tik apie 20% genomo yra vidutinio ir žemo dažnio kartotinės sekos. Tarp žemesniųjų eukariotų yra įvairių išimčių, kaip antai pirmuonių makrobranduolys, kuriame yra beveik vien kartotinė DNR.
- Gyvūnų vidutinio ir aukšto dažnio kartotinės sekos sudaro apie 50% genomo.
- Augalų ir amfibijų vidutinio ir aukšto dažnio kartotinės sekos gali siekti iki 80% genomo.

2. Kartotinės sekos yra įvairaus dažnio. Skirstomos į žemo, vidutinio ir aukšto (labai aukšto) dažnio sekas. Somatinėse ląstelėse jų dažnis gali keistis.

Žemo dažnio kartotinės sekos dažniausiai yra kartotiniai genai. Jų paskirtis aiški (žr. aukščiau). Kitos kartotinės sekos šiuo metu skirstomos ne tiek pagal jų dažnį, kiek pagal ilgį ir nukleotidų seką.

Vadovaujamasi maždaug tokiais suminiais šių kartototinių sekų sankaupų ilgiais:

10^5–10^7 bp – palydovinė DNR
10^2–10^3 bp – minisatelitas
14–200 bp – mikrosatelitas

Paprastosios kartotinės sekos. Palydovinė DNR. Paprastai tai trumpos dviejų ar kelių nukleotidų sekos. Tačiau pasitaiko ir sudėtingesnių sekų, kurias sudaro šimtai nukleotidų porų. Augalų B chromosomose sekos gali būti dar ilgesnės: 1,1–1,3 kb.

Trumpų kartotinių sekų sankaupos sudaro konstitutyvųjį heterochromatiną. Šis aptinkamas chromosomose kaip labiau kondensuoti segmentai. Žmogaus tokiai DNR tenka apie 5% genomo. DNR, kuri sudaro dideles paprastųjų kartotinių sekų sankaupas, vadinama **palydovine**. Mat pirmą kartą ji išskirta iš krabo chromosomos palydovo. Antai krabo palydovinėje DNR labai daug kartų kartojasi seka TAGG. Dažniausiai palydovinė DNR yra centromerose arba šalia jų, telomerose. Šios struktūros bus nagrinėjamos atskirai. 3.2 lentelėje nurodytos įvairių organizmų ir genetinių struktūrų palydovinės DNR kartotinės sekos telomerų galuose. Dažniausiai genome yra daugiau kaip vienas palydovinės DNR tipas. Išskiriama ultracentrifuguojant CsCl tankio gradiente.

Minisatelitai. Žmogaus genome 1980 m. buvo aptikti labai polimorfiniai hipervariabilūs lokusai, kurių įvairovę lemia skirtingas trumpų kartotinių sekų skaičius. Dėl šios priežasties tokios kartotinės sekos vadinamos **minisatelitais**, arba ***VNTR*** (angl. *variable number tandem repeat* – kintantis viena seka paskui kitą einančių kartotinių sekų skaičius). Rimtai šiomis sekomis susidomėta tik 1985 metais, kai buvo išaiškinta, kad įvairių individų minisatelituose bazinių kartotinių sekų skaičius labai svyruoja ir gali būti pritaikytas asmeniui genetiškai identifikuoti (vadinamiesiems pirštų atspaudams, angl. *fingerprinting* – nuo tikrojo pirštų atspaudų metodo identifikuoti asmenį). Pačios kartotinės sekos irgi šiek tiek skiriasi, sudarydamos vadinamąsias **šeimas.**

3.2 lentelė. **Paprastosios kartotinės nukleotidų sekos telomerų galuose**

Organizmų grupė tipas	Genetinė struktūra DNR	Paprastoji kartotinė seka (5′ → 3′)*
Blakstienotieji (*Ciliophora*)		
Infuzorijos (*Ciliata*), būrys *Hymenostomata* (*Tetrahymena, Paramecium*)	makrobranduolys	CCCCAA
Infuzorijos (*Ciliata*), būrys *Hypotricha* (*Stylonychia, Oxytricha, Euplotes*)	makrobranduolys	CCCCAAAA
Žiuželiniai (*Mastigophora*), būrys *Trypanosomatida* (*Trypanosoma, Leishmania*)	minichromosoma	CCCTA
Gleivūnai (*Physarum, Dictyostelium*)	rDNR (ekstrachromosominė)	CCCTA
Mielės (*Saccharomyces*)	chromosoma	$C_{2-3}A(CA)_{1-3}$
Augalai – vairenis (*Arabidopsis*)	chromosoma	CCCTAAA
Apvaliosios kirmėlės	chromosoma	GCCTAA
Žmogus, pelė	chromosoma	CCCTAA

*Dažnai nurodoma kitos DNR grandinės nukleotidų seka, pvz., žmogaus TTAGGG arba *Tetrahymena* – TTGGGG. Tai daroma dėl fermento **telomerazės** sudėtyje esančios ribonukleotidų sekos, kuri naudojama kaip matrica sintetinti telomerų kartotines sekas.

Įdomu tai, kad į minisatelitus panašių sekų aptikta ne tik žemesniųjų eukariotų (pirmuonių, grybų), bet ir bakterijų genome.

Mikrosatelitai. Tai irgi labai trumpos kartotinės 2–3 nukleotidų porų ilgio sekos. Normaliame genotipe šių sekų suminis ilgis vienoje vietoje yra tik iki 200 bp, todėl vadinamos **mikrosatelitais**. Irgi naudotos kaip pirštų atspaudų zondai. Tačiau pastaruoju metu mikrosatelitais labai domimasi, ypač žmogaus genetikoje. Mat mikrosatelitai gali būti trijų itin svarbių **žmogaus patologijos** reiškinių priežastis:

- chromosomų lūžių saitų;
- ligų (kaip antai nervų-raumenų);
- vėžio (jis gali būti susijęs su DNR reparacijos genais).

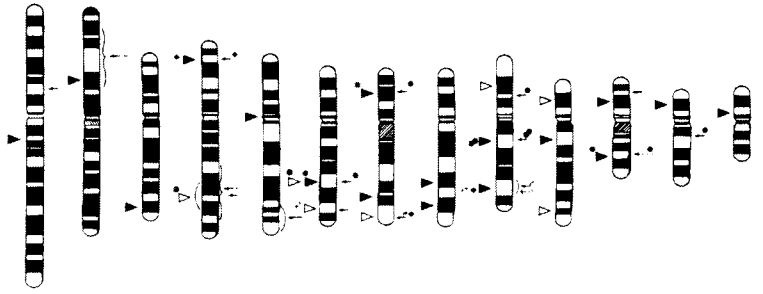
Visi šie trys žmogaus patologijos reiškiniai gali būti vienas su kitu susiję ir gali turėti bendrą priežastį – mikrosatelitą (3.3 lentelė).

Chromosomų lūžūs saitai, atrasti 1974 m. Saterlendo (G. R. Sutherland). Pirmasis saitas buvo nustatytas X chromosomoje, konkrečiai X chromosomos ilgajame petyje, 27.3 segmente, todėl jis buvo vadinamas **fraXq 27.3** (angl. *fragile*), arba (dabartinėje klasifikacijoje) **fraX–E.** Mat X chromosomoje yra keletas lūžių saitų.

Formaliai X chromosomos lūžumas paveldimas kaip dominuojantis, bet mažo penetrantiškumo (žr. p. 633) požymis. Dažniau ir žymiai stipriau pasireiškia vyrams (1:1500), kurie iš motinos paveldėję fraX. Tokie vyrai yra atsilikusios psichikos, būdingos išvaizdos: jų

3.3 lentelė. **Kartotinės sekos – lūžių saitų, paveldimų ligų, vėžio priežastis**

Liga/lūžus saitas, genas, chromosoma/lokusas	Seka	Dažnis
FRAX A (*FMR1*, Xq27.3)	**CGG**	200–1000
FRAX E (Xq28)	CGG/CCG	200–1000
FRAX F	CGG/CCG	300–500
FRA 16A	CGG/CCG	1000–2000
Progresuojanti chorėja (Hantingtono liga) (*HD*, 4p16.3)	**CAG (Glu)**	<42–100
Spinocerebrinė (susijusi su nugaros ir stuburo smegenimis) ataksija, 1-asis tipas (*SCA1, 6p23*)	CAG	<100
Spinobulbozinė (susijusi su nugaros ir pailgosiomis smegenimis) raumenų atrofija – Kenedžio liga (*AR*, Xq11-12)	CAG	<40–72
Machado-Joseph sindromas (*MJD. 14q 24.3–31*)	CAG	<100
Miotoninė distrofija (*DMPK*, 19q13.2–13.3)	CAG/CTG	200–4000
Storosios žarnos nepapilominis vėžys	**CA**	įvairus, iki
Mut L *PMS1* (2q31–33) nesuporuotų		200–6000
PMS2 (7p22) nukleotidų		"
MLH1 (3p21.3) reparacijos		"
Mut S *MSH6* (2p 16) genai		
MSH2(2p21–22)		



3.5 pav. **Žmogaus chromosomų lūžūs saitai, onkogenai ir vėžį sukeliančios chromosomų mutacijos:**
▶ lūžus saitas; ▷ onkogenas; • chromosomų mutacija, rodyklėmis nurodytos vietos, kurių delecija (◀----) arba translokacija (◀——) lemia leukozes. (Remiantis J. J. Yunis, A. L. Soreng, 1984)

veidas neproporcingas – sumažėjęs vidurinis trečdalis ir padidėję viršutinis bei apatinis trečdaliai, todėl smakras ir kakta atsikišę. Moterims fraX lūžumas pasireiškia dažniu 1:2500. Tačiau neseniai įrodyta, kad chromosomų lūžumas paveldimas **ne pagal Mendelio dėsnius.**

Lūžių vietų aptikta ir kitose chromosomose (3.5 pav.). Be to, nustatyta kai kurių lūžių vietų sąsaja su vėžiu (pvz., fra 16A). Atrandami vis nauji lūžūs saitai. Šiuo metu žmogaus chromosomose jų yra bent 21.

Lūži X chromosoma buvo pirmoji, kuriai išaiškinta lūžumo priežastis. Lūžumo vietoje yra genas (*FMR-1*), kurio reguliacinėje dalyje yra paprastoji kartotinė seka **CGG**. Ji gali būti, bet gali jos ir nebūti. Normalus jos dažnis 0–50. Nuo 50 iki 200 ar net iki 230 – dar **premutacinė būsena**. Toks saitas yra potencialus kandidatas į lūžumą. Ten, kur yra nuo 200–230 iki 1000 kartotinių sekų, – lūži vieta. Iš premutacinės į mutacinę būseną pereinama motinos organizme, tarp 5 ir 20 nėštumo dienų. Šiuo atveju lūžumas tik iš dalies susijęs su protiniu atsilikimu: **CpG** yra DNR metilinimo vieta (žr. p. 114), o reguliacinėje dalyje metilintas *FMR-1* genas yra neveiklus. Tai lemia protinį atsilikimą.

Paprastųjų kartotinių sekų kilmė. Kartotinių sekų polinkis į netolygų krosingoverį. Manoma, kad paprastosios kartotinės sekos atsiranda ir jų skaičius didėja dviem būdais: vykstant:

- šuoliškai DNR replikacijai,
- netolygiam krosingoveriui (3.6 pav.).

Kartotinių sekų ir genų sankaupos yra netolygaus krosingoverio „karštieji taškai".

Tokiose sankaupose homologinės chromosomos gali konjuguoti netiksliai, pasislinkusios, kaip tai pavaizduota 3.6 pav. ir 3.7 pav. Likę laisvi vienos ir kitos homologinių chromosomų kartotiniai segmentai sudaro kilpas (3.7 pav.). Po netolygaus krosingoverio vienoje iš chromosomų segmentas yra iškritęs – atsiranda **delecija**, o kitoje homologinėje chromosomoje – atitinkamas segmentas yra padvigubėjęs – atsiranda **duplikacija**.

Tačiau susiduriama su tokiu reiškiniu, kai kartotinių sekų skaičius padidėja labai staigiai. Pavyzdys gali būti *fraX–E*. Toks reiškinys aiškinamas **šuoliška replikacija**. Jis tik postuluojamas, dar neįrodytas. Gali būti, kad šuoliška replikacija vyksta dalyvaujant specialiems fermentams – atvirkštinėms transkriptazėms. Kai kurių jų sandaroje yra RNR seka, kuri kaip matrica naudojama DNR sintezei. Šia RNR matrica gali būti paprastosios kartotinės sekos. Kaip tik tokiu būdu fermentas telomerazė sintetina paprastąsias kartotines sekas telomerų galuose.

Tolygus krosingoveris kartotinių sekų vietoje

27 bp –GAAAAATGT|GAAAAATGT|GAAAAATGT–
:::::::::: ::: ir ::::: ::::::::::::: Sinapsė
27 bp – g a a a a a t g t |g a a a a a t g t |g a a a a a t g t –

↓ **Rekombinacija**

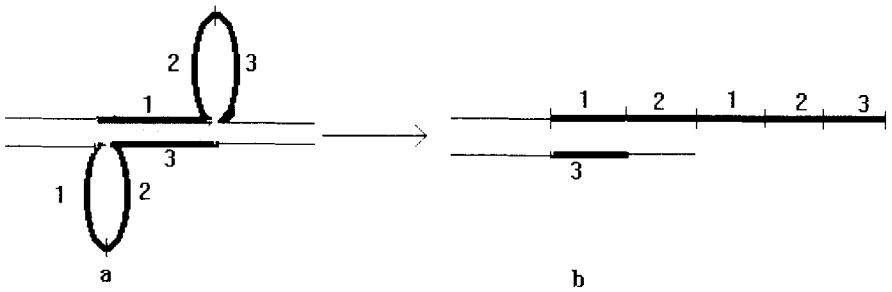
27 bp –GAAAAATGT|g a a a a a t g t |g a a a a a t g t–
ir ← Rekombinantinės DNR grandinės
27 bp – g a a a a a t g t |GAAAAATGT|GAAAAATGT–

Netolygus krosingoveris kartotinių sekų vietoje

27 bp –GAAAAATGT|GAAAAATGT|GAAAAATGT–
Sinapsė → :::::::::::
:: ::::::::::
27 bp –g a a a a a t g t |g a a a a a t g t |g a a a a a t g t–

Rekombinacija ↓
45bp –g a a a a a t g t |g a a a a a t g t |g a a a a a t g t |GAAAAATGT|GAAAAATGT–
(duplikacija) ir
9bp (delecija) –GAAAAATGT–

3.6 pav. **Netolygus krosingoveris kaip kartotinių DNR sekų amplifikacijos būdas:** po netolygaus krosingoverio vienoje DNR molekulėje segmentas padvigubėja, kitoje DNR molekulėje įvyksta delecija – segmentas iškrenta



3.7 pav. **Netiksli homologinių chromosomų konjugacija *a* – su poslinkiu kartotinių sekų sankaupos vietoje, *b* – jos pasekmės** (plg. su 3.6 pav.); *1, 2, 3* – kartotinės sekos

Retropozonai yra kaip tik tokios kartotinės genomo sekos, atsiradusios dėl atvirkštinės transkriptazės.

Tarp paprastųjų kartotinių sekų ir retropozonų yra du pagrindiniai skirtumai:

- retropozonai nėra sukaupti vienoje vietoje į sankaupas, o išbarstyti po genomą, todėl jie dar vadinami **išsklaidytaisiais (disperguotaisiais) genomo elementais**;
- skiriasi kilme, taigi ir nukleotidų sekomis.

Retropozonų nukleotidų seka tiesiogiai priklauso nuo to, kuri RNR buvo naudojama kaip matrica DNR sintezei. Pagal tai retropozonai yra **dviejų tipų**:

– ***LINES*** **– ilgi, sintetinti nuo pribrendusių RNR II polimerazės transkriptų.** Tipiški – 6500 bp ilgio. Žinduolių genome jų yra apie 20000–50000 (žmogaus – apie 10000, sudaro apie 5–6% genomo). Dažnai baigiasi poliA. LINES sekos yra neveiklios, neturi promotoriaus, intronų. Bet gali būti ir atvirų skaitymo rėmelių.

– *SINES* – trumpi, sintetinti nuo RNR III polimerazės transkriptų. Žmogaus genome ***Alu*** **šeima** (pavadinimas kilęs nuo to, kad ją kerpa AluI restriktazė) turi apie 700000 kopijų, yra 300 bp ir sudaro apie 6% genomo. *Alu* kilę iš vienos mažos (305 bp) 7S RNR. Ši 7S RNR įeina į struktūrą dalelių, kurios atpažįsta signalines polipeptido sekas, šiam integruojantis į membraną.

Kartotinių sekų reikšmė iki šiol neaiški. Vis dar sklando nuomonė, kad tai yra parazitinė DNR, privalomas (ultimatyvus) genomo parazitas. Bet net pagal bendrus genomo evoliucijos principus taip neturėtų būti, nes nereikalingas DNR sekas šalina atranka.

Be to, kaip minėta, visos DNR sintezės reikalauja didelių energijos išteklių. Taigi neekonomiška per 50% genomo tuščiai dauginti, neturint iš to naudos. Dėl to, kad kol kas kartotinių sekų, ypač retropozonų, funkcija genome neišaiškinta, dar nereiškia, jog šios DNR sekos nereikalingos. Kartotinių sekų reikšmę rodo pirmiausia neatsitiktinis jų pasiskirstymas ląstelės genome. Telomeros, (prie) centromeros satelitinė DNR tiesiogiai susijusi su šių chromosomos dalių funkcija. Be to, drozofilos chromosomų telomeriniuose galuose yra ne palydovinė DNR, o retropozonai.

Retropozonų vieta genome irgi neatsitiktinė. Jie yra arba genų 5′ ir 3′ šonuose, arba intronuose, arba tarpikliuose. Retkarčiais retropozonai yra transkribuojamoje geno dalyje. Nustatyta, kad nuo tokio geno transkribuota RNR sudaro specifinę antrinę sandarą ir dalyvauja vidiniuose branduolio dariniuose. Matyt, neatsitiktinis dalykas ir tai, kad kaip retropozonai yra gausiai multiplikuotos tik kai kurios subrendusios RNR, pvz., minėtoji 7S RNR (iš jos kilusi *Alu* šeima).

Didžioji kartotinių sekų dalis yra netranskribuojama. Kai kurie mikrosatelitai yra ir transliuojami. Šiuo atveju baltyme yra turtingi vienos kurios nors aminorūgšties rajonai: $(CGT)_n$ – turi daug glicino, $(CCA)_n$ – prolino. Įdomu ir tai, kad šuoliška mikrosatelito amplifikacija gali vykti ir transkripcijos, ir net transliacijos metu, t. y. ne DNR, o RNR. Tai irgi sukelia žmogaus ligas.

Kartotinės sekos gali būti **transkripcijos reguliatoriai**. Jas specifiškai atpažįsta kai kurie valdymo baltymai. Tai vaizdžiai parodyta transgenuose (genų inžinerijos metodais perkeltuose genuose).

Kartotinių sekų reikšmė rekombinacijos ir mutacijų atsiradimo procesuose nagrinėta aukščiau. Kartotinės sekos, ištęsdamos chromosomą, apskritai padidina krosingoverio tikimybę. Kartotinių sekų iškritos ir ypač intarpai yra gana dažna mutacijų priežastis. Tokie įvykiai nustatyti įvairiuose žmogaus genuose (α- ir β-globinų, LDL receptoriaus, net X chromosomos centromerinio heterochromatino).

Pseudogenai. Konkrečių organizmų genome, nuolat, kaip sistematikos požymis aptinkami neveiklūs genai, vadinami **pseudogenais**. Šis taksonominis jų pastovumas genome skiria pseudogenus nuo *nul*-mutacijų. Pseudogenai žymimi ψ. Jų kilmė dvejopa:

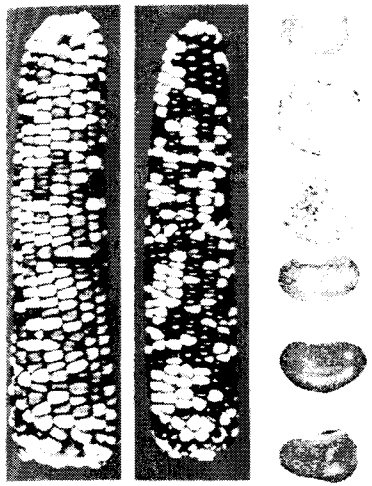
- **brendimo pseudogenai**. Tai aukščiau nagrinėti neveiklūs retropozonai, atsiradę dėl atvirkštinės transkriptazės veiklos;
- **pseudogenai dėl mutacijų.** Nuo retropozonų jie skiriasi tuo, kad turi intronus ir, tai ypač būdinga, – reguliacinę geno dalį. Tuo tarpu retropozonai paprastai šių geno dalių neturi. Pvz., triušio hemoglobino β-polipeptido pseudogene ψβ2 yra ir intronai, ir reguliacinė geno dalis. Tik šis genas neveiklus dėl rėmelio poslinkio mutacijos.

Kodėl pseudogenai yra pastovūs visam taksonui? Galima tik spėlioti, kad kažkuo pseudogenai svarbūs, ypač genų sankaupose, kaip β-globino genų sankaupos (žr. p. 279).

3.4. Judrieji genomo elementai

Judriųjų genomo elementų atradimas. Daugeliui margos augalų (žirnių, lubinų, pupelių ir kt.) sėklos nėra naujiena. Lygiai taip pat, kaip ir gyvulių veislės, kurioms būdinga marga kūno spalva. Tai paveldima ypatybė, vienas iš būdingų veislės požymių. Tačiau genai gali netolygiai pasireikšti įvairiose kūno ląstelėse dėl įvairių priežasčių. Be to, ne tik kūno spalvos genai. Paviršiaus pigmentacija yra tik labai patogus požymis stebėjimams atlikti.

Tuo pasinaudojo Maklintok, atkreipusi dėmesį į kukurūzų grūdo margumą. 1940 m. ją sudomino ne tiek nestabili grūdo pigmentacija, kiek šio nestabilumo



3.8 pav. **Genetinis kukurūzų nestabilumas**
(pagal B. McClintock):
kairėje – nestabilios grūdų mutacijos; **viduryje** – stabilios mutacijos (violetinė spalva);
dešinėje – įvairaus laipsnio grūdų margumas

priežastis – mutacijos. Tačiau tik po 10 metų intensyvaus darbo pradėjo aiškėti šių reiškinių priežastis.

Paprastai kukurūzų grūdai būna įvairių spalvų, bet apyvaisis vienspalvis, ne margas. Maklintok bandymuose ant geltonų grūdų atsirasdavo įvairaus dydžio violetinių dėmių (3.8 pav.). Mat vienspalvė (geltona) tirtų kukurūzų apyvaisio spalva buvo ne dėl to, kad jie neturėtų antociano – violetinio pigmento sintezę lemiančio ***C*** geno, o todėl, kad, be ***C*** geno, genotipe buvo dar nealelinis *I* genas. Šis genas slopino ***C*** geno veiklą. Kukurūzų genotipas buvo ***IICC***.

Nealeliniai genai, slopinantys kitų genų veiklą, buvo žinomi jau seniai. Jie vadinami **epistaziniais genais**, arba **supresoriais**. Taigi *I* genas yra epistazinis.

Spalvota grūdo dėmė atsirasdavo tada, kai vykdavo *I* geną inaktyvinanti mutacija, ir jis negalėdavo slopinti spalvos ***C*** geno. Ląstelės, kuriose tai atsitikdavo, ir tos, kurios iš jų buvo kilusios, buvo pigmentuotos. Tad kuo anksčiau grūdo raidoje įvykdavo mutacija, tuo didesnė buvo spalvota dėmė.

Mutacijas sukėlė genas, kuris keitė savo vietą chromosomoje. Tai nustatyta hibridologiniu metodu. Aptikti du tokie judrieji genai: *Ds* (disociatorius) ir *Ac* (aktyvatorius). *Ds,* įsiterpęs šalia *I* geno, sukeldavo toje vietoje chromosomų trūkius ir geno *I* mutacijas. Bet *Ds* tapdavo judrus tik aktyvintas kito šoklaus geno *Ac* (pastarojo judrumas buvo išaiškintas vėliau; Maklintok visą savo dėmesį buvo sutelkusi į *Ds*).

Dėl šios priežasties Maklintok priskiriamas ir atradimas, kurio ji iš tikrųjų nepadarė. Tai valdymo genai, genų veiklos valdymas. Manyta, kad *Ac* valdo (aktyvina) *Ds*. Net judriuosius genus Maklintok pavadino **kontroliuojančiaisiais elementais**. Taip jie vadinami ir šiuo metu.

Tačiau mokslas pilnas paradoksų. Kukurūzų kontroliuojančiųjų elementų *Ac* ir *Ds* sąveikos pobūdis paaiškėjo tik tada, kai buvo atrasti judrieji bakterijų genomo elementai, o *Ac* ir *Ds* – sekvenuoti (apie tai toliau). Paradoksas yra tas, kad viena iš dviejų pagrindinių judriųjų genomo elementų funkcijų yra **valdyti genų veiklą**

- arba įsiterpiant į geną ar genų grupę,
- arba keičiant genų vietą dėl padėties efekto.

Antroji pagrindinė šių elementų paskirtis – mutagenezė, mutacijų dažnio valdymas.

Maklintok ne tik pirmoji atrado judriuosius genomo elementus, bet ir išaiškino, kad jie sukelia genetinį nestabilumą – padidėjusį genomo ar pavienių genų mutacijų dažnį. Dažnos *I* geno mutacijos yra šio reiškinio pavyzdys.

Bakterijų Is ir Tn. Judriuosius bakterijų genomo elementus atrado tik 1968 m. Starlingeris (P. Starlinger) ir Šapira (J. A. Shapiro). Jie labai įvairūs, bet pagal struktūrą skirstomi į du bakterijų judriųjų genomo elementų tipus:

- **insercinės (įterptinės) sekos (IS),**
- **transpozonai (Tn).**

IS sekos yra trumpos (700–1000 bp) ir turi tik jų **pernašai reikalingus** genus. Visų IS struktūra bendrais bruožais yra vienoda.

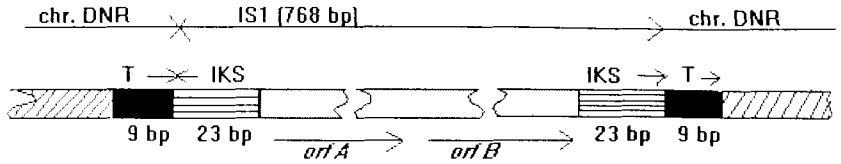
Judrumą lemia dvi struktūros ypatybės:

– IS galuose yra invertuotos kartotinės sekos (9–41 bp). Tai tos pačios nukleotidų sekos, tik priešingų krypčių nuo IS centro. Tokios sekos dar vadinamos **palindrominėmis** (gr. *palindromeo* – sugrįžtantis; palindromas yra kalbininkų terminas – frazė, turinti tą pačią reikšmę skaitant iš kairės į dešinę ar atgal, pvz., „sūnūs“).

– IS viduje yra vienas arba du genai (kartais ir daugiau), koduojantys transpozicijos fermentus.

Ta vieta, kur įsiterpia IS (ar kitas kuris judrusis elementas), vadinama **taikiniu**, arba **įtarpos seka**. Ji labai nedidelė – 3–13 bp. IS įsiterpus, ši seka arba jos dalis padvigubėja. Susidaro **tiesioginės kartotinės sekos**. Jos supa IS iš abiejų pusių. Vienos IS įsiterpia įvairiose genomo vietose, kitos tik tam tikrose vietose, tik į konkrečius genus. Tai priklauso nuo taikinių.

Nedidelio, bet tipiško *E. coli* IS1 struktūra yra tokia:



Čia **T** – **IS** įsiterpimo vieta, taikinys, tiesioginės kartotinės sekos; **IKS** – invertuotos kartotinės sekos IS galuose; *orfA*, *orfB* (angl. *open reading frame* – atviras skaitymo rėmelis) – genai, koduojantys transpozicijos fermentus.

Transpozonai (Tn) yra labai įvairaus ilgio, bet gerokai ilgesni už IS (2–25 kb ir ilgesni). Tai susiję su Tn struktūros ypatybėmis.

Nuo IS transpozonai skiriasi dviem sandaros ypatybėmis:

- turi ne tik genus, lemiančius transpoziciją, bet ir su ja visiškai nesusijusius genus;
- dažniausiai Tn sudaryti iš dviejų IS (galuose).

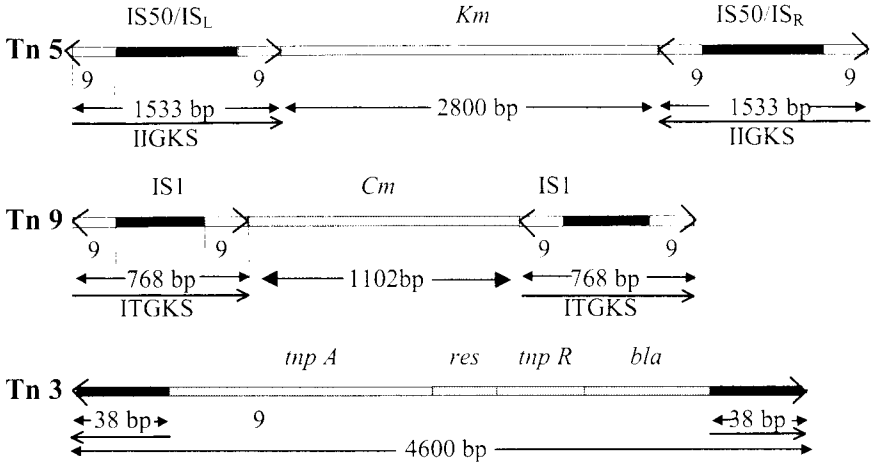
3.9 paveiksle pavaizduotos ne tik šios dvi sandaros ypatybės, bet ir pagrindiniai įvairių Tn sandaros skirtumai.

Pirmiausia yra labai didelė Tn įvairovė pagal galines sekas. Net tipiniu atveju, kai Tn galuose yra po IS, šios sekos gali būti įvairiai orientuotos: priešingomis kryptimis (kaip Tn5) arba viena kryptimi kaip (Tn9). Tuo tarpu Tn3 yra pavyzdys transpozono, kurio galuose apskritai nėra IS, o tik trumpos (38 bp) invertuotos sekos.

Labai didelė Tn įvairovė yra ir pagal transpoziciją koduojančius genus: ne tik pagal šių genų skaičių, bet ir pagal vietą – centrinėje dalyje (kaip Tn3) ar IS sekoje. Be to, šie genai gali būti veiklūs abiejose IS arba tik vienoje iš jų. Antai Tn5 veiklūs transpozicijos genai yra tik IS_R, t. y. dešiniojoje IS.

Vidinėje Tn dalyje yra genai, nuo kurių priklauso bakterijų atsparumas antibiotikams ir kitiems nuodams, pvz., gyvsidabriui. Tuo Tn labai panašus į R plazmides (žr. p. 239). Šių genų skaičius įvairiuose Tn taip pat labai nevienodas (iki 5 genų).

Transpozonų tipo judrieji elementai yra ir dirbtinai konstruojami iš dviejų judriųjų elementų (panašiai kaip iš dviejų IS natūralaus transpozono galuose). Tokios konstrukcijos naudojamos kaip **vektoriai genų inžinerijoje**. Taip, pvz., konstruojami vektoriai iš dviejų drozofilos P elementų.



3.9 pav. **Įvairių transpozonų struktūros palyginimas**:
Tn 5 – genas *Km* koduoja atsparumą *kanamicinui*; galuose invertuoti IS50 – atitinka IIGKS – ilgas invertuotas galines kartotines sekas (angl. *LRT*); IS50 galuose yra 9 bp invertuotos kartotinės sekos.
Tn 9 – genas *Cm* koduoja atsparumą *chloramfenikoliui*; galuose du tiesioginiai IS1 – atitinka ITGKS – ilgas tiesiogines galines kartotines sekas; IS1 galuose yra 9 bp invertuotos kartotinės sekos.
Tn 3 – genas *bla* koduoja atsparumą *ampicilinui* (β laktamazę); galuose yra trumpos invertuotos galinės kartotinės sekos – TIGKS (angl. *ITR*); genai *tnpA* ir *tpnR* koduoja transpozicijos baltymus; *res* yra reguliacinė seka. Nuo jos priklauso, ar replikonai bus sulieti – sudarys kointegratą, ar bus išskirti geno *tnp R* produkto rezolvazės. IS$_L$ – kairioji (angl. *left*), o IS$_R$ – dešinioji (angl. *right*) insercinės sekos

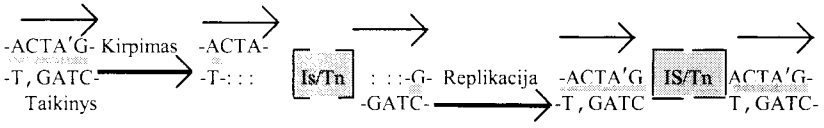
Visiškai pagrįstai prie judriųjų genomo elementų priskiriami **nuosaikieji virusai** ir **plazmidės** (žr. p. 237). Šios struktūros, įsiterpusios į chromosomą, irgi gali keisti genomo veiklą. Tai vienodai tinka ir bakterijoms, ir eukariotams. Vienija plazmides ir nuosaikiuosius virusus su Is ir Tn ir labai panašūs įsiterpimo į chromosomą būdai.

Transpozicija vyksta labai įvairiai. Skiriami du jos tipai:

- replikacinė, kai judrusis elementas ir išlieka senojoje vietoje, ir atsiranda naujoje, perkeliama tik viena DNR grandinė, o po to abiejose vietose vyksta neplaninė DNR sintezė;
- konservatyvioji, kai judrusis elementas iškerpamas iš senos vietos ir perkeliamas į naują vietą. Senojoje vietoje lieka dvigrandis trūkis, kuris arba užtaisomas, arba yra mirtinas. Eukariotų jis gali būti chromosomų mutacijų priežastis.

Tn ir IS sugeba patys save perkelti iš vienos vietos į kitą.

Jie turi genus, kurie koduoja specialią endonukleazę **transpozazę**. Šis fermentas labai tiksliai iškerpa judrųjį elementą iš abiejų pusių, tik skirtingose grandinėse. Taikinio vietoje kerpamos abi DNR grandinės, tik vėlgi skirtingose vietose, susidaro lipnūs galai:



Užpildžius vienagrandžius tarpus, taikinio seka arba dalis jo padvigubėja.

Tn ir Is gali įsiterpti ne tik į chromosomas, bet ir į kitas genetines struktūras, turinčias DNR (pvz., plazmides). Dėl šios priežasties bakterijose gali įvykti reiškinys, kuris vadinamas **replikonų susiliejimu**. Iš dviejų genetinių struktūrų susidaro viena (vadinamasis **kointegratas**). Pvz., taip gali susilieti dvi plazmidės. Tokiu atveju vieną genetinę struktūrą (plazmidę) nuo kitos skiria Is arba Tn kopijos.

Judrieji genomo elementai gali koduoti ir fermentą **rezolvazę**, kuris išskiria dvi sulietas genetines struktūras. Pasitaiko dviejų tipų judriųjų elementų mutacijų, dėl kurių šie praranda judrumą. Mutacija gali pažeisti galinę nukleotidų seką. Šiuo atveju judrusis elementas lieka visą laiką toje vietoje, kur jis tuo metu buvo. Nebent įvyktų grįžtamoji mutacija. Bet šios yra retos. Gali įvykti transpozazės genų mutacijos. Šiuo atveju elementas irgi tampa nejudrus, tačiau toks judrusis elementas gali pasinaudoti kitų, normalių judriųjų elementų genų produktais – fermentais, reikalingais transpozicijai.

Vėl *Ac* ir *Ds*. Pastarojo tipo mutantas yra kontroliuojantysis kukurūzų elementas *Ds*. Jis turi normalias galines sekas, bet yra įvykusi įvairaus dydžio delecija transpozazės gene. Tad jis naudojasi *Ac* transpozaze. *Ac* yra normalus judrusis elementas (4563 bp).

Judrieji eukariotų genomo elementai panašūs į prokariotų Tn ir Is, ypač į Tn3. Tik skiriami judrieji genomo **elementai trumpomis invertuotomis galinėmis sekomis** (jiems priklauso kukurūzų *Ac*, drozofilos P, judrusis *Alu* sekų tipas) ir ilgomis **invertuotomis galinėmis sekomis** (LTR, angl. *long terminal repeats*). Pastarajam priklauso tik eukariotams būdingas judriųjų genomo elementų tipas **retrotranspozonai**. Pavadinimas kilęs iš savito transpozicijos būdo.

10. 1313

Retrotranpozonai įsiterpia į genomą naudodamiesi atvirkštine transkriptaze, t. y. DNR→RNR→DNR→integracijos būdu.

Tuo retrotranspozonai sutampa su įsiterpusiais į genomą **retrovirusais** (žr. p. 549). Kaip minėta, retrovirusus, kaip ir nuosaikiuosius virusus, galima priskirti prie judriųjų genomo elementų. Nuo **retropozonų** (kartotinių sekų) retrotranspozonai skiriasi ne tik dydžiu (5–8 kb), bet ir tuo, kad jų viduje yra veiklūs genai. Dažniausiai tai genai, koduojantys **atvirkštinę transkriptazę** ir kitą fermentą, būtiną transpozicijai šiuo būdu, – **integrazę**. Tai nuklеazė, būtina įkirpti DNR. Galinės sekos (300–400 bp) yra tiesioginės, t. y. vienos krypties.

Galimi mišrūs retrotranspozonų transpozicijos būdai – naudojant ne tik atvirkštinę transkriptazę, bet ir transpozazę (kaip Tn/Is).

Transpozicijos valdymas. Kaip minėta, judrieji genomo elementai yra vienas iš genomo pertvarkos būdų. Kai kuriais atvejais valdymo sekų (pvz., *res*) turi patys Tn. Bet apskritai transpozicija valdoma iš šalies: arba specialių genų (dažniausiai supresorių), arba/ir aplinkos veiksnių. Nuosaikieji virusai ir plazmidės daugiau ar mažiau valdymo genų turi savo genome.

3.5. Chromosoma

3.5.1. Molekulinė chromosomos sandara

Eukariotai skiriasi nuo prokariotų viena iš esminių genomo sandaros ypatybių – **chromosomomis.**

Manoma, kad lemiamu momentu eukariotų genomo fragmentacijai į chromosomas atsirasti buvo genomo dydis. Jeigu visa žmogaus DNR sudarytų vieną molekulę, jos ilgis būtų 1,74 m. Suprantama, kad tokios DNR molekulės erdvinis išsidėstymas, sintezė, kopijų pasiskirstymas neįmanomi. Tačiau žmogaus chromosoma ir pagal esamą padėtį yra labai didelė – vidutiniškai 100 000 kb DNR. Taigi eukariotų DNR yra ne tik

- **fragmentuota į chromosomas,**
- bet ir **stipriai kondensuota**.

Be to, chromosomos kondensacija keičiasi ląstelės dalijimosi cikle ir priklausomai nuo chromatino funkcijos.

Chromatinas yra DNR ir baltymų kompleksas interfaziniame branduolyje. Tačiau pagrindinis DNR–baltymų kompleksas **nukleosoma** išlieka ir ląstelei dalijantis. Keičiasi tik nukleosomų ir bendras chromatino erdvinis išsidėstymas, taip pat kondensacija įvairiose mitozės ir mejozės stadijose ir fazėse.

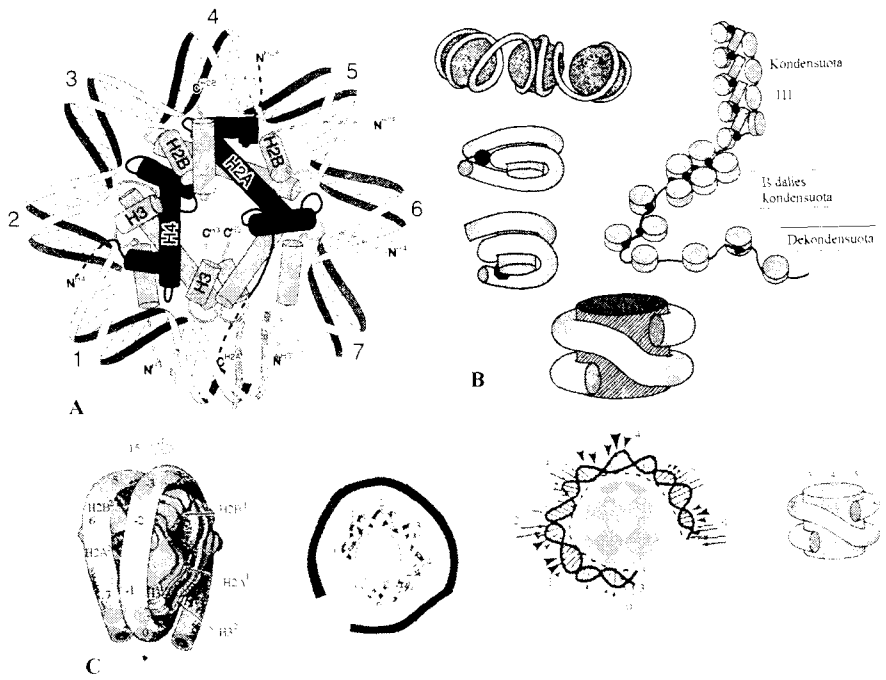
Chromatinas susideda iš DNR ir dviejų tipų baltymų – bazinių (histonų) ir rūgščiųjų (nehistoninių). DNR+histonų kompleksas sudaro savitą struktūrą nukleosomą. Ji yra pagrindinis kartotinis eukariotų chromosomos sandaros vienetas.

Skiriama **visa nukleosoma** ir **minimalioji nukleosoma,** arba **nukleosomos šerdis** (angl. *core*). Minimaliąją nukleosomą sudaro savitai išsidėstę (3.10 pav., *A*) keturių tipų baziniai baltymai **histonai** (po dvi molekules): H3, H4, H2A, H2B ir DNR. Apie ritinio pavidalo histonų šerdį DNR siūlas apsivynioja 1,75 karto (3.10 pav., *B*). **Lankstų vietose DNR** yra **deformuota** (3.10 pav., *C*). Tai svarbu biologiškai. Deformuotos DNR vietos yra labiau atakuojamos įvairių veiksnių: pvz., HIV (imunodeficito viruso), Dnazės I, mutageninių veiksnių – laisvųjų radikalų (•OH), singletinio deguonies. Šiuo atžvilgiu svarbi ir mažojo ir didžiojo griovelių DNR grandinėje padėtis ant histonų šerdies (3.10 pav., *A, C*).

Vieną nukleosomą su kita jungia DNR atkarpa, vadinama **jungtuku**. Jungtuko DNR yra prieinamesnė mutagenams, negu apsivyniojusi aplink histoninę šerdį DNR. Jungtuko dydis labai įvairus – nuo 8 iki 114 bp. Tai lemia ir visos nukleosomos ilgį. Mat visą nukleosomą sudaro **minimali nukleosoma + jungtukas**. Vidutiniškai nukleosomos DNR ilgis 200 bp, tačiau mielių *Saccharomyces cerevisiae* nukleosomos ilgis yra tik 165 bp, žinduolių – 180–200 bp, o jūrų ežio net 260 bp.

Prie jungtuko DNR jungiasi histonas H1 (arba kiti šio histono šeimos baltymai, pvz., H5). Nuo jų priklauso chromosomos kondensacija, veikla ir net ląstelių diferenciacija.

DNR apie histoninę šerdį gali apsivynioti **atsitiktinai** arba **tiksliai nustatytomis** nukleotidų sekomis (pastarasis reiškinys vadinamas **fazavimu** – angl. *phasing*, arba *positioning*). Pastaruoju atveju toje pačioje chromosomoje įvairių nukleosomų dydis nevienodas.



3.10 pav. **Nukleosoma ir chromosomos sandara:**
A – šerdies histonų sąveika su DNR, nukleosomoje pavaizduota tik viena DNR apvija apie šerdį ir tik po vieną histonų H2A, H2B ir H4 molekulę;
B – DNR apsivyniojusi apie histonų šerdį beveik du kartus, juodu apskritimu pavaizduota galima histono H1 padėtis;
C – DNR siūlo deformacija apsivyniojant apie histoninę šerdį. → vietos, kuriose DNR skaido DNRazė I, ➤ vietos, kurias atakuoja ŽIV (angl. ***HIV***) integrazė (pagal A. P. Wolffe, 1995)

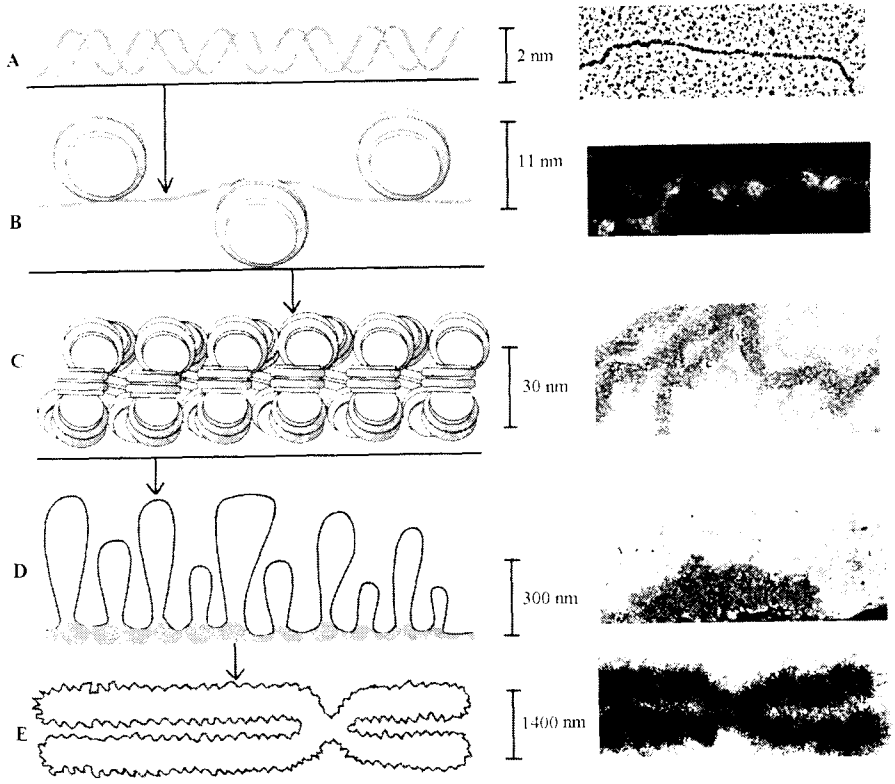
Nukleosominis chromatinas būdingas interfaziniam branduoliui. DNR yra 2 nm skersmens (3.11 pav., *A*). Dėl nukleosominės sandaros chromatino siūlas storėja iki 11 nm. Toks yra nukleosominio kamuoliuko skersmuo (3.10 pav., *B*). Nukleosominis chromatinas yra 30 nm skersmens (3.11 pav., *C*). Kaip jis susidaro, nėra galutinai išaiškinta. Pastaruoju metu manoma, kad įvairiais būdais. Histonai H1 skatina interfazinės chromosomos susidarymą. Nukleosomų sankaupose **nukleomerose** yra 5–7, iki 15 nukleosomų.

Domeninė chromosomos sandara (3.11 pav., *D*) pirmiausia aptikta bakterijose, paskui metafazinėse eukariotų chromosomose ir tik vėliau – interfaziniame branduolyje.

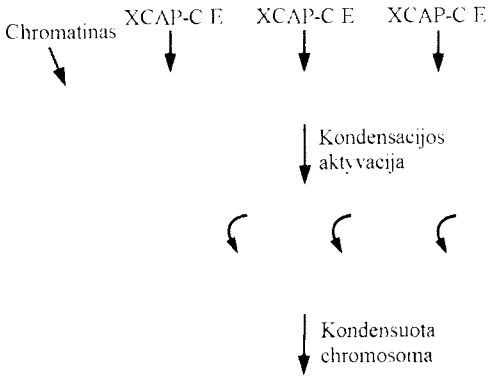
Chromosomos domenai – tai 50–100 kb ilgio 30 nm chromatino kilpos, kurios tvirtinasi prie pamato – pastolių, sudarytų iš baltymų.

Baltymai žymimi **Sc** (angl. *scaffold* – pastoliai). Kol kas atrasti trys baltymai: Sc I, Sc II, Sc III, bet jų turėtų būti daugiau.

Sc I – pirmasis nustatytas chromosomos baltymas. Pasirodo, jis yra II topoizomerazė. Tai fermentas – specifinė endonukleazė, kuri dalyvauja visuose reiškiniuose, kur reikia išvynioti, ištiesinti DNR (replikacijoje, rekombinacijoje ir kt.). Ji kerpa DNR abiejose grandinėse ir po to vėl susiuva trūkius. II topoizomerazės mutantai žūva, nes negali išsiskirti chromosomos mitozės pabaigoje.



3.11 pav. **Chromosomos kompaktizacijos lygiai:**
A – DNR skerspjūvis; *B* – nukleosominis; *C* – nukleosominis (dar labiau kompaktiškas); *D* – domeninis (pagrindinis interfaziniame branduolyje); *E* – metafazinė chromosoma



3.12 pav. **Chromatino kilpų susidarymas ir chromosomos kondensacija dalyvaujant baltymui XCAP-C/E**

Sc II, arba **XCAP-C/E** (angl. *heterodimeric coiled-coil* – dimeras iš C ir E polipeptidų) baltymas yra gal net svarbesnis chromosomos domenams-kilpoms atsirasti. Jis yra **judėjimo baltymas**. Manoma, kad būtent jis suartina chromatiną į domenų kilpas (3.12 pav.).

Metafazinės chromosomos (3.11 pav., *E*) yra labiausiai kondensuotos ir menkiausiai ištirtos. Jas ištirti trukdo tai, kad ląstelei dalijantis chromosomos visą laiką keičia savo sandarą, ir tai trunka labai trumpai. Manoma, kad metafazinėse chromosomose domeninė chromosomos sandara toliau vystosi, kilpos glaudžiasi viena prie kitos. Be to, jos gali būti stambesnės. Toliau vystosi ir **baltyminiai chromosomos pastoliai**. Suardžius arba išplovus DNR, chromosoma išsaugo savo išvaizdą.

Kompaktiškos, trumpos metafazinės chromosomos yra fiziškai patogiausios paskirstyti tarp dukterinių branduolių/ląstelių. Sandara atitinka paskirtį.

Chromatino sandara eukariotų interfaziniame branduolyje irgi geriausiai atitinka interfazinio branduolio paskirtį. Nuo jos priklauso:

- chromatino/genų veikla,
- DNR replikacija,

- DNR rekombinacija ir reparacija,
- pradiniai ląstelės dalijimosi etapai.

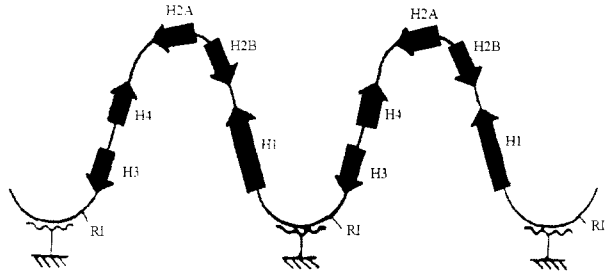
Todėl visiškai suprantama, kad ir interfazinio chromatino sandara keičiasi priklausomai nuo ląstelės vyksmų. Vienokia ji yra specifinės veiklos, diferencijuotose, bet nesidalijančiose ląstelėse, kitokia – ląstelėse, kurios aktyviai dalijasi, ypač S ir G_2 stadijose.

Jau senokai nustatyta, kad chromosomos interfaziniame branduolyje **išsidėsčiusios neatsitiktinai**. Chromatinas sąveikauja su dviem interfazinio branduolio struktūromis, su:

- tankiąja plokštele – lamina (jos baltymais laminais A, B, C), kuri iškloja branduolio apvalkalėlį iš vidaus;
- branduolio skeleto-matrikso siūlais (fibrilėmis).

DNR yra specialios sekos, kuriomis interfazinė chromosoma tvirtinasi prie matrikso/laminos baltymų. Šios sekos vadinamos **MAR** (angl. *matrix attachment region*) arba **SAR** (angl. *scaffold attachment region*). Gali būti, kad ir interfazinės chromosomos iš dalies sąveikauja ir su tais pačiais Sc I, Sc II (XCAP-C/E), kurie yra ir domeninės chromosomos pastoliuose. Antai branduolio matrikse yra 70% visos II topoizomerazės (Sc I). MAR sekoje yra II topoizomerazės pažinimo vieta. Joje vyrauja AT poros (apie 70%).

MAR/SAR sekų vieta DNR yra neatsitiktinė. Ji susijusi su chromatino veikla. Antai histonų kartotinėse genų sankaupose prie baltyminių pastolių tvirtinamasi tomis vietomis, kur baigiasi viena histonų genų sankaupa ir prasideda kita (3.13 pav.). Interfaziniame branduolyje chromatino kilpos yra nepastovios, nes ne visas chromatinas



3.13 pav. **Vietos chromosomos „pastoliuose“**, prie kurių tvirtinasi kartotiniai histonų genai

veiklus – veikli yra tik vos žymi jo dalis. Neveiklioji chromatino dalis gali būti labiau kompaktiška – gali sudaryti **heterochromatiną**.

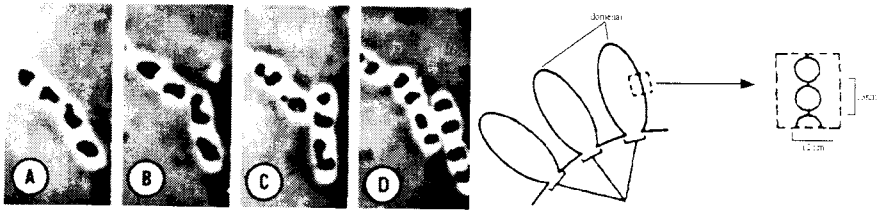
Prokariotų chromosoma, palyginti su eukariotų chromosoma, yra labai paprastos sandaros. *E. coli* chromosoma – tai žiedinė (apie 1100 μm) ilgio DNR molekulė. Vis dėlto ji yra kondensuota ir sudaro kompaktišką darinį **nukleoidą** (3.14 pav., *a*). Prisiminkime, kad DNR molekulės skersmuo yra 2 nm. DNR yra neigiamai superspiralizuota ir sudaro kompleksus su baziniais baltymais. Jų yra keletas (H4, H1, arba kitaip H-NS; P). Jie pasiskleidę po visą nukleoidą. Iš baltymų net susidaro kamuoliukai, menantys eukariotų nukleosomos histoninę šerdį. Bet tikrų nukleosomų nėra.

Kaip ir eukariotų interfazinio branduolio, bakterijų chromosoma sudaryta iš kilpų-domenų. *E. coli* chromosomoje yra apie 100 domenų. Vidutinis domeno dydis –apie 40 kb.

Domenai – tai dar viena kompaktiškos nukleoido sandaros priežasčių, ko gero, pagrindinė, nes, kaip ir eukariotų atveju, tai būdas erdviškai-funkciškai orientuoti bakterijų genomą. Skiriasi įvairių domenų dydis, DNR superspiralizacija.

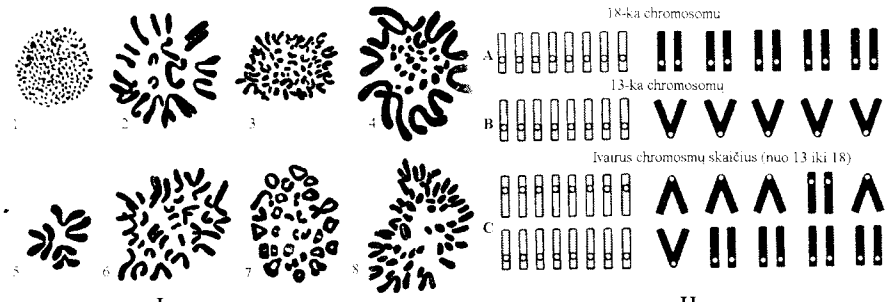
Bakterijų chromosomos domenų (3.14 pav., *b*) pamate yra ne tik baltymai, bet ir RNR. Tačiau apskritai erdvinė bakterijų chromosomos orientacija nėra visiškai aiški. Bakterijų nukleoidas neturi nei apvalkalėlio, nei matrikso. Kokios RNR ir kokie baltymai yra jų chromosomos domenų pamate, irgi kol kas nenustatyta.

Bakterijų chromosoma gali kontaktuoti su ląstelės apvalkalėliu, ypač kai vyksta DNR replikacija. Dėl šio kontakto DNR molekulės kopijos tiksliai paskirstomos tarp dukterinių ląstelių.



a b

3.14 pav. **Bakterijų nukleoidai:**
a – Escherichia coli gyvose, besidalijančiose ląstelėse, skiriasi pagal stebėjimų trukmę (iš kairės į dešinę nuo 0 iki 21 min.), matyti persismaugę nukleoidai (remiantis E. J. DuPraw, 1970); *b – E. coli* chromosomos domenai (kilpos), o kilpose – kamuoliukai, menantys eukariotų nukleosomos šerdį



3.15 pav. **Rūšinis kariotipo savitumas ir chromosomų polimorfizmas:**
kairėje – kariotipai: *1* – upinio vėžio (98); *2* – lydekos (12); *3* – arklio (66); *4* – salamandros (34); *5* – uodo (6); *6* – katės (38); *7* – jaučio (60); *8* – avies (54); skliaustuose nurodytas diploidinis chromosmų skaičius; dešinėje – jūrų sraigės *Thais lapillus* chromosomų polimorfizmas: *A* – kariotipas sraigių, gyvenančių vietovėse, kur menki potvyniai (kariotipe – 18 chromosomų); *B* – kur dideli potvyniai (13 chromosomų dėl susiliejimo centromeromis); *C* – tarpinės formos (chromosomų skaičius tarp 13 ir 18). Tamsiai pavaizduotos chromosomos, kurios arba yra, arba gali susilieti centromeromis

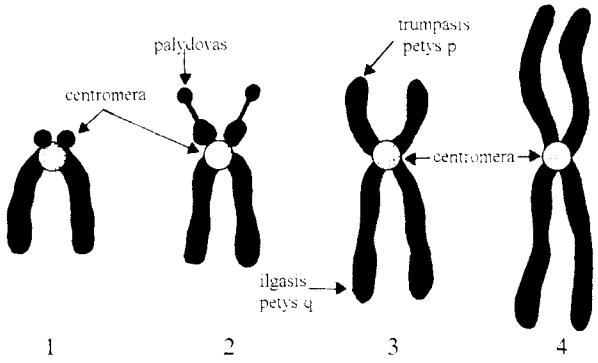
3.5.2. Eukariotų chromosomų morfologija. Kariotipas, rūšinis jo savitumas. Heterochromatinas ir specifinės sandaros bei paskirties chromosomos

Kariotipas. Idiograma. Įvairių organizmo rūšių kariotipo savitumas. Kiekvienai organizmų rūšiai būdingas tam tikras chromosomų skaičius, dydis, kitos morfologinės savybės. Tai rodo 3.15 paveiksle pavaizduoti kai kurių organizmų chromosomų rinkiniai – kariotipai.

Bene daugiausia chromosomų turi kai kurie paparčiai (1260), radioliarija (1600), mažiausiai arklinė askaridė – tik 2 (1 porą), augalas *Haplopappus* – 4. Citogenetiškai patogiau tirti organizmus, kurių ląstelėse nedaug chromosomų, kaip vaisinės muselės (*Drosophila melanogaster*), turinčios 8 chromosomas, ir kurių chromosomos yra stambios kaip drozofilos gigantinės ar pupų (*Vicia faba*) (žr. toliau) chromosomos.

Kariotipas – tai organizmo chromosomų visuma, apibūdinama chromosomų dydžiu, išvaizda ir skaičiumi. Jis yra paveldima kiekvienai organizmo rūšiai būdinga savybė, kaip ir kiti požymiai.

Įvairios skirtingų organizmų ir to paties organizmo chromosomos apibūdinamos taip: dydis, centromera ir jos padėtis chromosomoje, pečiai ir jų ilgis, antrinė sąsmauka, palydovai (3.16 pav.).



3.16 pav. **Chromosomų tipai:**
1 – akrocentrinė (pečiai labai nelygūs); *2* – akrocentrinė su palydovu; *3* – submetacentrinė (pečiai nelygūs); *4* – metacentrinė (lygiapetė)

Chromosomų dydis metafazėje yra nuo 0,2 iki 50 μm, žmogaus – nuo 1,36 ± 0,3 iki 6,8 ± 1,4 μm. Ilgiausioje žmogaus chromosomoje DNR siūlas yra 16 cm.

Chromosomos išvaizda labiausiai priklauso nuo **centromeros**. Ji esti pirminėje sąsmaukoje. Iš abiejų jos pusių susidaro kinetochoras, prie kurio tvirtinasi **achromatinės verpstės mikrovamzdeliai**. Centromera dalija chromosomą į **pečius**. Pagal centromeros padėtį chromosomos gali būti **metacentrinės**, lygiapetės, t. y. centromeros dalijamos į du lygius pečius, jų forma metafazėje X raidės; **submetacentrinės**, kai centromera yra ne ties chromosomos viduriu, susidarę pečiai yra ne visai lygūs; **akrocentrinės (telocentrinės)**, kai centromera yra beveik chromosomos gale (tokios chromosomos metafazėje V raidės formos). Nedidelėse, ovalinėse chromosomose (pvz., drozofilos IV chromosoma) gali būti **difuzinė** centromera, t. y. verpstės siūlai gali prisitvirtinti bet kuriame taške.

Chromosomoje gali būti ir **antrinė sąsmauka**. Kaip minėta, joje susidaro branduolėlis. Bet ne visada taip būna. Kartais antrinė sąsmauka esti labai ryški, ir atrodo, kad viena chromosomos dalis susijungusi su kita plonu siūleliu. Trumpesnioji chromosomos dalis (ypač jeigu ji nedidelė) vadinama **palydovu**.

Pagal kariotipą galima apibūdinti organizmų gentis, o kartais ir rūšis. Yra net mokslo šaka **kariosistematika**. Tačiau kariotipo specifiškumo svarba organizmui kol kas neaiški. Nenustatytas ryšys tarp organizmų evoliucijos ir chromosomų skaičiaus jų ląstelėse. Pavyzdžiui, žmogus turi 46 chromosomas, višta – 78, avis – 54, drozofila – 8, upinis

vėžys – 98 ir t. t. Tačiau didesnis ar mažesnis chromosomų skaičius turi įtakos genetinei rekombinacijai.

Geriausiai chromosomų morfologinės ypatybės įžiūrimos mitozės ir mejozės metafazėje. 3.17 pav. kariotipai pavaizduoti metafazėje. Chromosomos gali būti iš metafazių nuotraukų iškerpamos ir išrikiuojamos pirmiausia pagal dydį, paskui ir pagal kitas aukščiau aptartas jų morfologines ypatybes. Toks grafinis kariotipo pavaizdavimas vadinamas **idiograma** (žr. 1.11 pav.). **Lytinės chromosomos (X, Y)** idiogramoje gali būti ten, kur joms priklauso būti pagal dydį ir išvaizdą, arba jų vieta yra po **autosomų** (nelytinių chromosomų).

Heterochromatinas ir chromosomos sandara. Įvairiais būdais nustatyta, kad ir toje pačioje chromosomoje chromatinas yra netolygiai kondensuotas. Net šviesiniu mikroskopu galima įžiūrėti mazgelius – **chromomeras**. Gigantinėse chromosomose (žr. toliau) matyti tamsesnės juostos – **Balbijanio žiedai**. Elektroniniu mikroskopu interfazinėse chromosomose matyti mazgeliai (angl. *knobs*).

Skiriamos trys kondensuoto **heterochromatino klasės:**

- kondensuotasis euchromatinas,
- fakultatyvusis heterochromatinas,
- konstitutyvusis heterochromatinas.

Euchromatinas pagal klasikinį apibūdinimą yra mažiau kondensuotas ir genetiškai aktyvus, t. y. DNR turi genetinę informaciją – genus. Tačiau dauguma genų specializuotuose, diferencijuotose ląstelėse yra neveiklūs. Veiksmingiausias būdas genų veiklai slopinti – euchromatino kondensacija. Tai vienodai tinka ir kondensuotam euchromatinui, ir fakultatyviajam heterochromatinui. Skiriasi jie tik kondensuotos chromatino dalies dydžiu, laipsniu ir trukme.

Neveiklūs interfaziniame branduolyje genai yra labiau kondensuoti ir sudaro smulkius mazgelius. Tai ir yra **kondensuotasis euchromatinas**. Jis yra savitas įvairiems audiniams. Tik spermatozoiduose yra inaktyvintas visas genomas. Panašiai yra ir augalų vyriškojo gametofito – mikrosporos generatyvinių ląstelių branduoliuose.

Fakultatyvusis heterochromatinas – irgi kondensuotas, tik stipriau, euchromatinas. Be to, kondensuoti arba dideli chromosomos segmentai, arba ištisos chromosomos. Kondensuotos vietos išryškėja diferencinio dažymo būdu **C juostomis**. Šiuo būdu nusidažo būtent heterochromatinas. Fakultatyvusis heterochromatinas gali būti **ilgalaikis**, kaip žinduolių X chromosomos, pavirtusios labai kondensuotu Baro kūneliu (žr. p. 193).

Konstitutyvųjį heterochromatiną, kaip minėta, sudaro kartotinių sekų sankaupos. Jis skirstomas pagal vietą chromosomoje:

- **centromerinis,**
- **telomerinis,**
- **NOR** (angl. *nucleolus organiser region*) – branduolėlio organizatoriaus vietoje.
- **mazgelinis** įvairiose (nei aukščiau minėtose) chromosomos dalyse. Jis sudaro heterochromatino **mazgelius** (angl. *knobs*). Jie irgi išryškėja dažant C juostomis. Interfazinėse chromosomose mazgeliai matomi pro elektroninį mikroskopą.

Specifinės sandaros ir paskirties chromosomos labai priklauso nuo chromatino kondensacijos. Genetiškai inertiškos B chromosomos, didelė dalis Y chromosomos yra beveik vien iš heterochromatino. Tuo tarpu aktyviose ląstelėse gali būti **dekondensuotos,** specifinės sandaros chromosomos. Tai **politeninės chromosomos, chromosomos–„lempų šepečiai“.**

Lytinės chromosomos yra įrodymas, kad savitą paskirtį gali turėti ir normalios kondensacijos chromosomos. Tokios yra lytinės X chromosomos. Jos genetiškai labai talpios.

Nors lytis paveldima labai įvairiai, bet dažniausiai ją lemia **lytinės chromosomos**. Jas turi ir kai kurie **augalai**:

- kanapės (*Cannabus sativa*),
- apyniai (*Humulus lupulus*),
- smidras (*Asparagus officinalis*),
- vynmedis (*Vitis vinifera*),
- šakinys (*Melandrium album*),
- poliploidinės žemuogių (*Fragaria*) rūšys ir kt. Šie augalai yra dvinamiai.

Lytinės chromosomos labai įvairios. Skirtingų lyčių individai skiriasi lytinių chromosomų skaičiumi arba/ir išvaizda. Kai jos skiriasi dydžiu ir forma, vadinamos **X ir Y chromosomomis**. Dažniausiai Y chromosoma yra mažesnė už X chromosomą, bet jos gali būti vienodo dydžio. Tada skiriasi savo sandara, pvz., heterochromatino kiekiu. Žmogaus Y chromosoma ne tik mažesnė, bet ir beveik vien tik iš heterochromatino, turi nedaug genų. Kariotipe gali būti keletas nehomologinių X chromosomų porų ir tik viena arba nė vienos Y chromosomos. Pastaruoju atveju lytis skiriasi chromosomų skaičiumi (pvz., taip yra žiogo).

Visos kitos chromosomos vadinamos **autosomomis,** arba **A chromosomomis**.

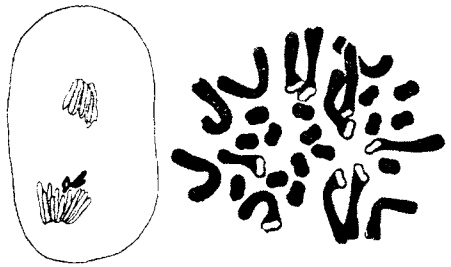
Papildomosios, arba B, chromosomos yra viena didžiausių citogenetikos mįslių. Jas atrado dar 1906 m. Vilsonas (E. B. Wilson) vabzdyje *Metapodium*, bet iki šiol neaiški nei jų funkcija, nei kaip jos atsiranda. Mat jos nėra kariotipo būtinybė. B chromosomos iš tikrųjų yra papildomosios chromosomos. Jos gali būti, bet gali jų nebūti. Be to, aptinkamos tik **autbrydingo** (angl. *breeding* – veisimas) būdu besiveisiančių organizmų kariotipe, t. y. tik tų, kurių apsivaisinime dalyvauja du partneriai. Pvz., jų neturi savidulkiai augalai.

Kariotipe chromosomos papildomai atsiranda ir dėl **heteroploidijos** arba **amplifikacijos (mini-chromosomos)**. Bet jų kilmė aiški. Jos yra homologinės kuriai nors pagrindinio kariotipo chromosomai ar jos daliai. Tuo tarpu B chromosomos nėra homologinės nė vienai iš A arba lytinių chromosomų, arba jų segmentų.

B chromosomas sudaro beveik vien konstitutyvinis heterochromatinas, bet kitoks, negu A arba Y chromosomose.

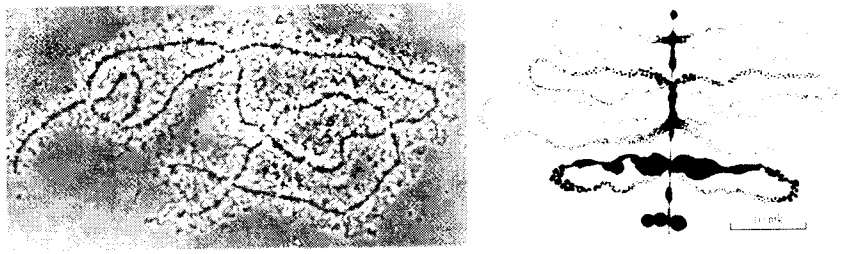
Jos dažniausiai yra smulkesnės už A chromosomas, (3.17 pav.), bet gali būti ir vienodo dydžio.

Pastaruoju metu nustatyta, kad B chromosomos skatina mejozę ir rekombinaciją mejozės metu, generatyvinių ląstelių mitozę po redukcinio dalijimosi, selektyvų apsivaisinimą. Ir pačios B chromosomos išlieka (paveldimos) dėl selektyvaus apsivaisinimo, teikiant pirmenybę toms lytinėms ląstelėms, kurios turi B chromosomas. Bet B chromosomų skaičius kariotipe negali didėti iki begalybės, yra subalansuotas. Pasiekus tam tikrą lygį (rugių kariotipe – 6 B chromosomas), sumažėja tokių individų vaisingumas.



3.17 pav. **Augalų B chromosomos**: kairėje – rugio (*Secale cereale*) chromosomos su viena B chromosoma žiedadulkės 1-oje mitozėje: padvigubėjusi B chromosoma paskirstoma netaisyklingai – patenka į vieną dukterinį branduolį; dešinėje – eraičino (*Festuca pratensis*) kariotipas (2n=14)+14B chromosomų (remiantis A. Müntzing, 1961)

Chromosomos–„lempų šepečiai“ esti daugelio stuburinių gyvūnų ovocituose mejozės diplotenos stadijoje. Taip jos pavadintos dėl daugybės į šonus išsikerojusių ataugėlių (3.18 pav.). Šių chromosomų atradėjui Riukertui



a b

3.18 pav. **Chromosomos – „lempų šepečiai“:**
a – konjugavusios dvi homologinės tritono (*Triturus*) chromosomos-„lempų šepečiai“ (iš J. D. Gall, 1966); *b* – mRNR sintezė (žymėtojo uridino įjungimas chromosomos-„lempų šepečio“ šepetėliuose; pažymėta juodai)

(J. Rückert, 1892) jos priminė šepečius, kuriais buvo valomi senųjų žibalinių lempų stiklai.

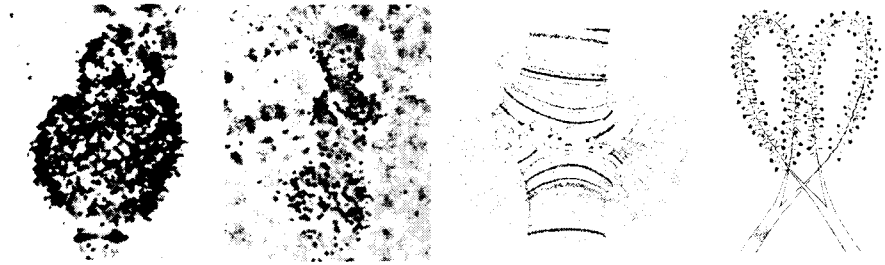
Chromosomos–„lempų šepečiai“ iš tikrųjų yra dviejų homologinių chromosomų kompleksas – **bivalenta**. Chromosomos viena kitos laikosi chiazmais – susikryžiavimo vietomis. Tokioje būsenoje chromosomos–„lempų šepečiai“ gali būti keletą mėnesių. Susiduriame su **uždelstąja mejoze**.

Chromosomos–„lempų šepečiai“ 20–40 kartų ilgesnės už įprastąsias chromosomas. Taip yra todėl, kad jos dekondensuotos į atskirus domenus (3.18 pav., *b*). Jie yra nepastovūs. „Pirmyn ir atgal“ kilpomis ištempiami skirtingi chromatino domenai. Tai atlieka baltymai – aktinas, nukleoplazminas ir kt. Domenuose intensyviai sintetinama mRNR. Tai nustatyta žymėtuoju uridinu.

Panašių į „lempų šepečius“ dekondensuotų chromosomų gali būti ir kitose ląstelėse. Antai panaši į juos yra Y chromosoma drozofilos spermatocituose. Išsišakojusios domenų chromosomos aptiktos pupų šaknelių tįstamajame audinyje. Nelaimė ta, kad galimybės tirti chromosomas diferencijuotose ląstelėse yra labai ribotos. Tokios ląstelės nesidalija.

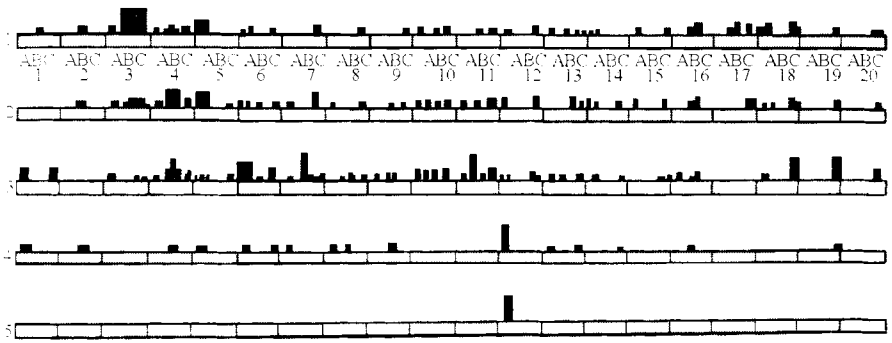
Politenines, arba gigantines, chromosomas atrado dar 1881 m. Balbijanis (G. Balbiani) uodo trūklio (*Chironomus*) lervose, jų seilių liaukų ląstelėse. Vėliau jos atrastos ir kitų vabzdžių, tarp jų ir drozofilos, sekreciją vykdančiose lervų ląstelėse.

Politeninės chromosomos jau aprašytos I skyriuje (žr. p. 40 ir 1.9 pav.). Patogu tirti šių chromosomų sandarą ir net nedidelius, vieno lokuso dydžio, sandaros pokyčius – chromosomų mutacijas, nes politeninės chromosomos tarytum išmargintos juostomis ir brūkšniais. Tai Balbijanio žiedai. Jie gerai matyti ir pro šviesinį mikroskopą dėl tikrai gigantiško šių chromosomų dydžio. Jos 70–250 kartų ilgesnės už normalias chromosomas, todėl stipriai dekondensuotos. Tačiau imponuoja ne tik jų ilgis, bet ir storis.



a b c d

3.19 pav. **Pūpsnio (pufo) sandara ir veikla** (remiantis W. Beermann, U. Clever, 1964):
a – *Chironomus* pūpsnis, kuris susidaro paveikus hormonu ekdizonu – intensyviai vyksta mRNR sintezė, įjungiamas žymėtasis uridinas (tamsūs taškeliai); *b* – ta pati vieta gigantinėje chromosomoje, tik prieš tai, kai buvo panaudotas ekdizonas, paveikta RNR sintezės inhibitoriumi aktinomicinu *D* – pūpsnis nesusidarė, mRNR sintezė labai silpna; *c* – bendra pūpsnio sandara; *d* – atskiros chromonemos kilputės pūpsnyje, iš šonų – mRNR molekulės



3.20 pav. **Pūpsnių kaita 1-oje *Chironomus dorsalis* chromosomoje įvairiose raidos stadijose** (remiantis I. Kiknadze, 1965):
juodais stačiakampiais pavaizduoti chromosomos segmentai, kuriuose yra susidarę pūpsniai; stačiakampio dydis vaizduoja pūpsnio dydį: *1* – 7–8 porų lerva; *2* – 9–10 porų lerva; *3* – prieš virstant lėliuke; *4* – jauna lėliukė; *5* – sena lėliukė

Politeninė chromosoma iš tikrųjų yra bivalenta – dvi labai glaudžiai konjugavusios homologinės chromosomos, kuriose chromomera (DNR) daug kartų padvigubėjusi.

Daug kartų vyko DNR sintezė, bet DNR kopijos neišsiskyrė, liko vienoje chromosomoje. Drozofilos politeninių chromosomų skerspjūvyje yra 2048 DNR molekulės, o kai kurių uodų – net 32768. Iš čia kilęs šių chromosomų pavadinimas (gr. *poly* – daug + *tenos* – siūlas).

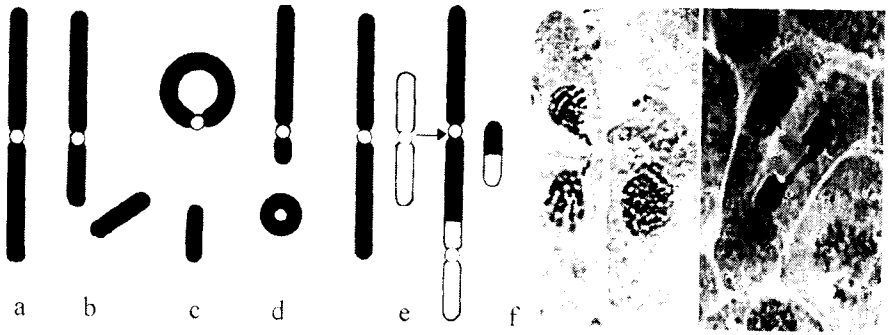
Atkreiptinas dėmesys ir į tai, kad homologinių chromosomų konjugacija yra įvykusi **ne mejozėje, o somatinėse ląstelėse**. Kaip minėta (ir tai matyti 1.4 pav.), tai labai palengvina aptikti chromosomų mutacijas. Be to, visos politeninės chromosomos sudaro vieną kompleksą. Jas vienija vadinamasis **chromocentras**. Jį sudaro **konstitutyvusis heterochromatinas**. Antai drozofilos patinėlių seilių liaukų ląstelėse chromocentre yra Y chromosoma.

Nors politeninės chromosomos stipriai dekondensuotos, bet jų sandara nėra pastovi. Tie lokusai, kurie yra labai aktyvūs, išsipučia į **pūpsnius** (pufus). Pūpsniuose DNR yra itin dekondensuota ir vyksta intensyvi mRNR sintezė (3.19 pav.). Tai nustatoma žymėtuoju uridinu. Pūpsnių vieta nepastovi (3.20 pav.), keičiasi organizmo raidoje ir įvairiuose audiniuose priklausomai nuo to, kokie genai tuo metu yra itin veiklūs.

3.5.3. Specialiosios chromosomos dalys

3.5.3.1. Telomeros

Telomeros ir chromosomų aberacijos. Dvi svarbios funkcinės chromosomos dalys buvo įrodytos ištyrus chromosomų aberacijas.



3.21 pav. **Chromosomų aberacijos:**
a – normali chromosoma; *b* – fragmentai; *c* – centrinis žiedas ir acentrinis fragmentas; *d* – centrinis fragmentas ir acentrinis žiedas; *e* – dicentriko (tilto) susidarymas, šalia – susijungę du acentriniai fragmentai; *f* – chromatidiniai tiltai pupų (*Vicia faba*) ląstelėse po poveikio EDTA

Chromosomų aberacijos – tai įvairūs chromosomų sandaros pokyčiai, atsiradę spontaniškai arba jas paveikus mutagenais.

Chromosomų aberacijos yra įvairių tipų – chromosominės, chromatidinės ir kt. Šiuo atveju mus domina tik tie chromosomų sandaros pokyčiai, kurie susiję su telomeromis. Paprasčiausias ir dažniausias chromosomų aberacijų tipas yra **fragmentas** (3.21 pav.). Kai fragmentas atitrūksta nuo chromosomos galo, ši netenka telomeros. Štai tada ir išaiškėja chromosomos galų reikšmė. Trūkio vietoje chromosomų fragmentų (tiek su centromera – centrinių, tiek be jos – acentrinių) galai yra lipnūs, labai lengvai jungiasi. Kai susijungia du fragmentai, kurie turi centromerą, susidaro **dicentrikas**. Šio tipo aberacijos, kaip ir acentriniai fragmentai, svarbūs tiriant centromeros paskirtį (žr. toliau).

Pasitaiko ir tokių atvejų, kai fragmentai atitrūksta nuo abiejų chromosomos galų. Likusi vidinė chromosomos dalis galais gali jungtis ir sudaryti **žiedą**.

Taigi svarbiausia telomerų paskirtis yra apsauginė: saugoti galus nuo sulipimo, taip pat nuo nukleazių, kurios skaido DNR. Net trūkio vietos neįveikia nukleazės. Trūkio vietoje nuo nukleazių saugo specialūs **kepurės baltymai** (angl. *capping protein*). Šie baltymai jungiasi prie bet kokio dvigrandžio trūkio. Tai tik paryškina chromosomos ir joje saugomos genetinės informacijos vientisumo svarbą. Tačiau telomerų reikšmė yra įvairi (žr. toliau), ne tik apsauginė.

Chromosomos galų problema. Ši problema yra tik linijinių genetinių struktūrų: nebūtų galų, nebūtų ir problemos. Bakterijų, daugumos virusų, daugelio nebranduolinių genetinių struktūrų (mitochondrijų, chloroplastų, plazmidžių ir kt.) DNR yra žiedinė, neturi galų, tačiau pasitaiko ir linijinių struktūrų, pvz., kai kurių virusų.

Telomerų sandara. Skiriamos dvi dalys: **telomera** (siauroja prasme) ir **subtelomera**. Iš tikrųjų reikėtų skirti dar trečią dalį – pačių atokiausių chromosomos galų. Tik ši dalis, matyt, yra ne visų organizmų chromosomose.

Telomeras (siaurąja prasme) sudaro savita palydovinė DNR – paprastosios kartotinės telomerų sekos (žr. 3.2 lentelę). Įvairių organizmų ir skirtingų genetinių struktūrų šių paprastųjų kartotinių sekų skaičius labai skiriasi. Antai žmogaus chromosomoje jų yra iki 2000 (arba 10–14 kb), *Tetrahymena* makrobranduolio chromosomų galuose – tik 70, mielių chromosomoje dar mažiau (bendras ilgis 300–450 bp). Mažiausiai yra žiuželinių minichromosomų galuose – tik 3–5 (be to,

11. 1313

skirtinguose galuose nevienodai: 5′ gale – 20 bp, o 3′ gale – 20 bp+16 bp vienagrandės DNR).

Palyginti neseniai nustatytas įdomus reiškinys. Kartotinių sekų skaičius, net tos pačios ląstelės chromosomų telomerose, yra nepastovus. Senstančio žmogaus somatinėse ląstelėse telomeros vis trumpėja. Antai odos ir kraujo ląstelių chromosomose telomeros sutrumpėja iki 15–40 bp (galbūt net šios sekos visiškai išnyksta). Manoma, kad tai gali nulemti žmogaus gyvenimo trukmę.

Vėžinėse ląstelėse surasta nepaprastai trumpų telomerų, ir tai gali būti pamatas tokioms ląstelėms save sunaikinti (apoptozė, žr. p. 347). Bet taip yra ne visose ląstelėse. Antai makrocituose, limfocituose sekų skaičius nekinta, o spermoje, atvirkščiai, senstant telomeros ilgėja.

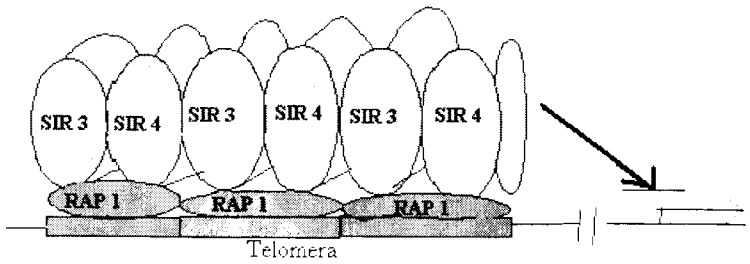
Telomerų galuose aptinkami **vienagrandžiai DNR trūkiai**, kurių vieta yra **kanoninė** (t. y. pastovi to taksono individams ir chromosomoms). Antai *Tetrahymena* šie trūkiai pasiskirstę taip:

5′...CCCCA! CCCCAACCCCAA ! CCC...
||||| |||||||||||| |||
3′...GGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG...

Tačiau šių trūkių paskirtis kol kas neaiški. Manoma, kad juos pažįsta **specifiniai baltymai.** Baltymai gali jungtis ir su paprastosiomis kartotinėmis sekomis.

Antai mielių *Saccharomyces* prie kartotinių sekų jungiasi itin svarbus reguliacinis baltymas RAP 1 (angl. *repressor/activator protein 1*), be to, ne vienoje vietoje, o kas 18 bp. Šioje chromosomos dalyje jis reguliuoja kartotinių sekų skaičių. Panašių reguliacinių baltymų aptikta ir kitų organizmų ląstelėse, žmogaus – net keletas.

RAP 1 baltymas valdo ir telomeroje bei subtelomeroje esančių genų veiklą. Be to, kaip rodo baltymo pavadinimas, vienų genų veiklą jis slopina, o kitų – aktyvina. Tai priklauso nuo nukleotidų sekų, su kuriomis sąveikauja šis baltymas, ir nuo sąveikos su kitais baltymais. Aiškėja, kad telomerų sąveika su branduolio matriksu ir vidine branduolio membrana irgi priklauso nuo šio baltymo. Antai kai RAP 1 baltymas sąveikauja su SIR (angl. *silent information regulator*) baltymais, telomeros aplinkoje esančių genų veikla slopinama:



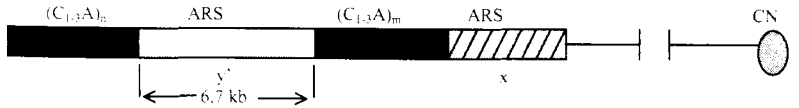
Telomerų įvairovė. Paprastosios telomerų kartotinės sekos yra labai konservatyvios (žr. 3.2 lentelę). Seka CCCTAA/TTAGGG yra ne tik žmogaus, pelės, bet ir kitų gyvūnų telomerose. Net ir labai nutolę organizmai – apvaliosios kirmėlės, aukštesnieji augalai, gleivūnai, žiuželiniai turi tokią pačią (arba labai artimą) palydovinę DNR telomerų galuose.

Neįprastos yra drozofilos chromosomų telomeros. Jas sudaro kartotinės sekos, bet ne paprastosios, o judrieji genomo elementai. Jie yra dviejų tipų: vieni **retropozonai**, o kiti **retrotranspozonai**. Jų sintezę ir prijungimą atlieka atvirkštinė transkriptazė. Kokių dar netikėtumų galima tikėtis tiriant didesnį skaičių organizmų, sunku numatyti. Mat kitų ištirtų vabzdžių telomeriniuose galuose yra paprastosios kartotinės sekos. Jos yra net homologinės žmogaus telomerų paprastosioms kartotinėms sekoms – būtent $(CCTAA/TTAGG)_n$.

Subtelomerų genetinė sandara yra savita ne tik taksonų, genetinių linijų (kamienų), bet ir skirtingų tos pačios genetinės linijos chromosomų. Šioje telomeros dalyje yra genai.

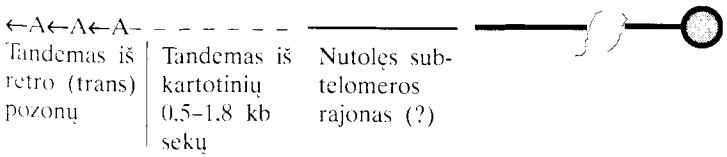
Rūšinį subtelomerų savitumą lemia specifinės kartotinės sekos, kurios yra ilgesnės negu paprastosios. Subtelomeroje yra genų. Jie irgi lemia to paties taksono įvairių chromosomų telomerų genetinį savitumą. Neįprasta šių genų vieta lemia kai kurias šių genų savybes, kurių neturi genai vidinėje chromosomos dalyje (žr. toliau). Paprastųjų kartotinių sekų gali būti aptinkama ir subtelomerose. Subtelomerose yra ir nukleotidų sekos DNR sintezei pradėti (*ori*, ARS).

Palyginimui pateikiama visa mielių ir drozofilos telomera.



Čia CN – centromera. $(C_{1-3}A)_{n,m}$ – paprastosios kartotinės sekos, y′ ir x – specifinės kartotinės sekos, jų sudėtyje yra ARS; y′ seka gali būti pakartota 1–4 kartus, o x sekos ilgis svyruoja plačiose ribose – nuo 0,3 iki 3,75 kb.

Drozofilos telomera skiriasi ne tik telomeriniais galais, bet ir subtelomeros sandara:



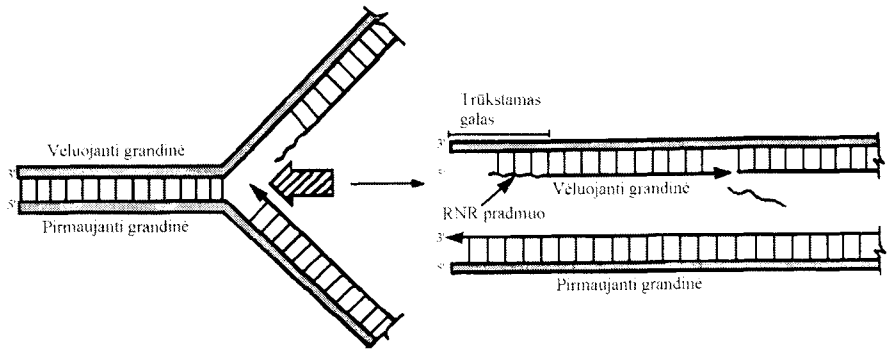
Čia ← – retropozonai (Het-A) ir retrotranspozonai (TART), jų skaičius nepastovus; – – – savitos kartotinės sekos – įvairaus ilgio tiek pačios sekos, tiek visas rajonas.

Ne tik kiekvienos chromosomos subtelomeros dydis ir nukleotidų sekos yra savitos, bet net chromosomos pečių. Antai 3D chromosomos subtelomeros ilgis 13 kb, o 2K chromosomos – 10,5 kb. Pastarąjį petį sudaro kartotinės 460 bp ir 150 bp ilgio sekos, o likusi šio peties 3,5 kb yra savita, koduojanti.

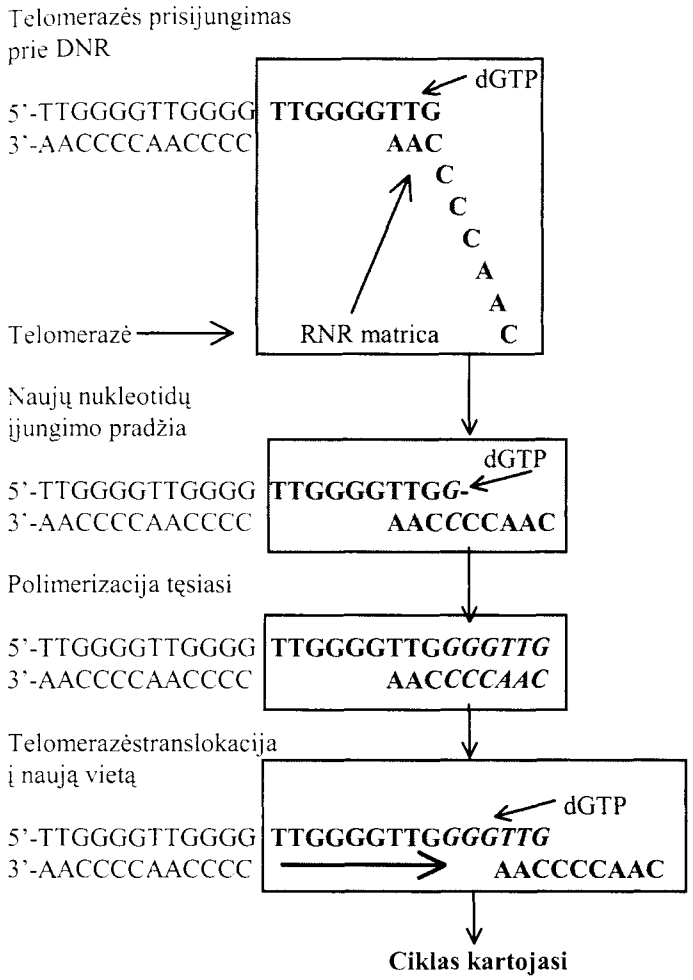
Telomerazės. Paprastųjų kartotinių sekų sintezė. Visiškai akivaizdu, kad telomerų kartotinių sekų skaičius reguliuojamas. Ir tai yra būtinybė. Po kiekvienos DNR replikacijos telomeriniai galai privalo sutrumpėti (3.22 pav.) ir turi būti fermentas, kuris kompensuotų šių kartotinių sekų netektį. Visa tai buvo iš tikrųjų įrodyta.

Mat replikacinei DNR polimerazei reikalingi –OH galai, todėl ji nepajėgi užpildyti pačių atokiausių vėluojančios DNR grandinės galų. Taigi po kiekvienos DNR replikacijos šiose grandinėse liks neužpildytas tarpas. Kuo daugiau kartų vyksta DNR sintezė, tuo daugiau turėtų būti prarasta kartotinių sekų telomerų galuose.

1984 m. mokslininkės Greider (C. W. Greider) ir Blekbarn (E. H. Blackburn) aptiko fermentą **telomerazę**. Tai atvirkštinė transkriptazė. Ji sintetina paprastąsias kartotines DNR sekas nuo RNR matricos. **Matrica yra telomerazės sandaroje.** Tai įvairaus ilgio poliribonukleotidas (*Tetrahymena* – 159 b, *Euplotes* – 192 b ir pan.). Jame savo ruožtu yra nukleotidų seka (irgi įvairaus ilgio), kuri komplementari telomerų paprastosioms kartotinėms sekoms (atitinka 1,5–3 sekas). Ja pažįstama vieta telomeroje, ir ji yra matrica telomerų galams naujai papildyti (3.23 pav.). Bet ji aktyvi ne visose ląstelėse. Generatyvinėse ląstelėse telomerazės genas yra veiklus (ekspresuojamas).



3.22 pav. **Telomeros galo trumpėjimas vėluojančioje DNR grandinėje vykstant DNR replikacijai**



3.23 pav. **Telomerazė sintetina telomerinius chromosomos galus**

Tuo tarpu daugumos somatinių ląstelių telomerazės genas neveiklus, todėl, kaip minėta, po kiekvieno šių ląstelių dalijimosi telomerų galai trumpėja. Vėžinėse ląstelėse šis genas gali suaktyvėti.

Atrastas ir kitas telomerų kartotinių sekų kompensacijos būdas – rekombinacinis: trūkstami telomerų galai užpildomi naudojant matrica antrąją DNR grandinę (arba molekulę).

Prie genetinių struktūrų, kurios atsiranda individo raidoje (infuzorijų subchromosomos ar minichromosomos, ekstrachromosominė DNR) telomeros yra prijungiamos. *Tetrahymena* tai atlieka telomerazė. Pastovių chromosomų ši dalis sintetinama S stadijoje kartu su visos chromosomos DNR.

Pačius linijinių struktūrų galus gali „užlipdyti" baltymai. Manoma, kad dalyvauja tie patys jau anksčiau minėti kepurės baltymai.

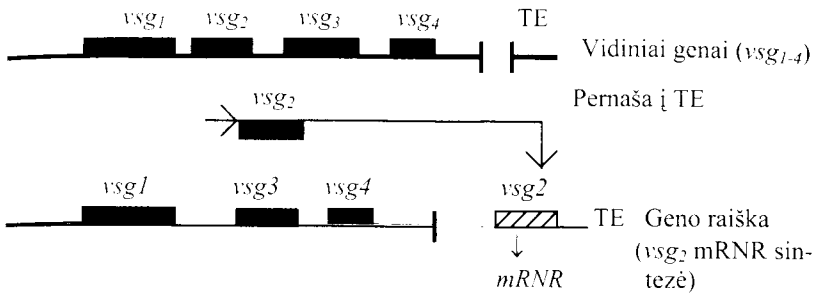
Telomerų reikšmė. Nuo seno žinoma ne tik **apsauginė** chromosomų reikšmė, bet ir tai, kad jos lemia homologinių chromosomų sąveiką mejozėje. I profazės diplotenos-diakinezės stadijose ir I metafazėje homologinės chromosomos laikosi viena kitos (sudaro bivalentą) tik telomeriniais galais. Ir kitos chromosomų sąveikos vyksta telomeriniais galais. Būtent,

- nuo telomerinių galų prasideda homologinių chromosomų konjugacija mejozėje;
- erdvinis chromosomų išsidėstymas interfaziniame branduolyje. Telomeriniais galais chromosomos kontaktuoja su vidine branduolio membrana ir tankiaja plokštele (lamina).

Genų veikla/genomo pertvarka ir telomeros. Kaip minėta, subtelomeroje gali būti įvairūs genai. Antai keturi kartotiniai mielių maltozės metabolizmo genai (*MAL1, MAL4, MAL5, MAL6*) yra chromosomų (II, III, VII, XI) subtelomerose. Panašiai ir sacharozės metabolizmo genai *SUC* yra subtelomerose.

Miegligės sukėlėjo *Trypanosoma* genai, esantys telomeroje, sąlygoja ląstelės paviršinio antigeno – **variabiliojo paviršinio glikoproteino** (VPG, angl. *VSG – variable surface glycoprotein*) sintezę. Šio baltymo sintezę koduoja apie 1000 *Trypanosoma* genų (jie sudaro apie 10% genomo).

VPG genetika yra sudėtinga, todėl į smulkmenas nesigilinsime, bet būtina nurodyti, kad *vsg* genai yra ne tik vidinėje chromosomos dalyje, bet ir šalia telomeros. Pastarieji gali veikti arba neveikti ir neperkelti iš vienos vietos į kitą. Tyrinėtojus domina ne tiek pastoviai šalia telomeros esantys *vsg* genai, kiek tie, kurie iš vidinės chromosomos dalies perkeliami šalia telomeros. Iš šios *vsg* genų grupės veiklus genas yra tik tas, kuris atsiduria šalia telomeros esančiame vadinamajame **ekspresijos saite.** Maždaug kas savaitę į šalia telomeros esantį ekspresijos saitą pakliūva (pernešamas) vis naujas genas:



Kokia nauda parazitui iš tokios *vsg* genų pernašos ir savotiško jų veiklos valdymo? Milžiniška. Tarp parazito ir šeimininko vyksta amžina kova, Ir *vsg* genetika vienas iš tobuliausių parazito „išradimų". Šeimininko ląstelėje prieš *Trypanosoma* paviršinius antigenus sintetinami antikūnai. Tačiau vos tik šeimininkas spėja įsigyti atsparumą – pradeda gaminti antikūnus, parazitas – šast, ir pakeitė paviršinius antigenus... Vėl viskas iš naujo.

Ir mielių subtelomeriniai *SUC, MAL* genai gali būti perkelti į kitas chromosomas. Tuomet irgi keisis jų veikla, kuri ir taip jau savitai valdoma dėl šių genų vietos subtelomerose.

Ektopinė konjugacija. Rekombinacija „telomera-telomera" (gr. *ektopos* – ne vietoje, perkeltas). Šie pokyčiai, kaip ir minėtos sąveikos tarp chromosomų, priklauso nuo telomerų sandaros, būtent nuo kartotinių sekų, ypač nuo paprastųjų kartotinių sekų. Šiomis sekomis gali konjuguoti net nehomologinės chromosomos, nes viso kariotipo paprastosios kartotinės sekos yra tapačios. Tai ir yra ektopinė konjugacija. Telomerose, paprastųjų kartotinių sekų sankaupose, lengvai vyksta netolygus krosingoveris.

Ektopinės konjugacijos pasekmės gali būti dvejopos:

- telomeriniuose galuose esantys genai lengvai perkeliami iš vienos chromosomos į kitą;
- gali vykti netolygus krosingoveris tarp nehomologinių chromosomų – susidaryti delecijos ir translokacijos.

Vadinasi, telomerų sandara ir su ja susiję reiškiniai iš dalies paaiškina labai svarbią genetikos problemą – kodėl atsiranda chromosomų mutacijos. Kaip galėjome įsitikinti, dėl netolygios paprastųjų kartotinių sekų konjugacijos ir po to netolygaus krosingoverio atsiranda delecijos ir duplikacijos. Dėl ektopinės nehomologi-

nių chromosomų konjugacijos, kurios priežastis irgi yra telomeros sandara, atsiranda delecijos ir tarpchromosominės translokacijos.

Vidinėje chromosomos dalyje dėl kartotinių sekų irgi gali įvykti tokios pačios chromosomų mutacijos.

3.5.3.2. Centromeros. ARS

Normaliai chromosomos veiklai būtinos dar dvi dalys: DNR replikacijos pradžios seka ir centromera.

Centromera – genetiškai itin svarbus chromosomos darinys. Jis paskirsto DNR kopijas/chromatides (dukterines chromosomas) dukteriniams branduoliams. Visi pagrindiniai eukariotų požymių paveldėjimo reiškiniai susiję su centromeros veikla. Kaip ir telomerų, centromerų paskirtis ir reikšmė nustatyta chromosomų aberacijų/mutacijų (delecijų) metodu. Netekusios centromeros, chromosomos dažniausiai prarandamos. Anafazėje praradusios centromerą chromosomos lieka ekvacinėje metafazės plokštumoje. Jos netempiamos į polius ir vertinamos kaip atsiliekančios chromosomos. Chromosomos be centromeros prilygsta acentriniam, t. y. neturinčiam centromeros, fragmentui. Per kiekvieną ląstelės dalijimąsi kas dešimta chromosoma be centromeros prarandama.

Gali būti ir priešingai – susidaryti chromosoma su dviem centromeromis. Tokia chromosoma vadinama **dicentriku**. Ji atsiranda susijungus dviem centriniams fragmentams, t. y. fragmentams, turintiems centromerą. Įdomiausia tai, kad achromatinės verpstės mikrovamzdeliai nuo vieno poliaus tvirtinasi prie vienos centromeros, o nuo kito poliaus – prie kitos centromeros. Taigi dicentrikas vienu metu tempiamas į abu polius. Citologiniuose preparatuose matomi vadinamieji **tiltai** (žr. 3.21 pav.). Šitaip tempiamas dicentrikas sutrūkinėja.

Labai panaši padėtis yra ir mejozėje. Konjugavusios homologinės chromosomos sudaro bivalentus. Tai dviejų homologinių chromosomų kompleksas. Jis irgi yra su dviem centromeromis. Tik centromerų padėtis yra tiksliai orientuota. Vėl prie bivalento vienos iš centromerų mikrovamzdeliai tvirtinasi nuo vieno poliaus, o prie kitos centromeros – nuo kito poliaus. Dėl to viena iš homologinių chromosomų tempiama į vieną polių, o kita – į kitą. Šis reiškinys, galima sakyti, netyrinėtas. Suprasti, kaip jis valdomas, galėtų padėti ir dicentrikų tyrimai.

Centromerų funkcijos yra tokios:

- orientuoti chromosomas mitozėje ir mejozėje, ypač metafazėse – chromosomos centromeromis išsidėsčiusios ekvacinėje plokštumoje ir orientuotos polių link;
- taisyklingai paskirstyti dukterines chromosomas (chromatides) ir homologines chromosomas ir judėjimui suteikti kryptį link polių.

Mitozės metafazėse chromatidės kontaktuoja viena su kita tik centromeromis, o su achromatinės verpstės mikrovamzdeliais – **netiesiogiai, per kinetochorus** (gr. *kinetikos* – susijęs su judėjimu + *choreo* – judu į priekį).

Centromerų sandara yra sudėtinga. Tai DNR–baltymų kompleksas. Be to, abiejose centromeros pusėse yra po kinetochorą. Todėl visų šių komponentų sandarą reikia tirti atskirai.

Centromerų DNR. Pati paprasčiausia iš tirtų yra mielių *Saccharomyces* centromera (tik apie 120 bp). Tačiau šioje trumputėje centromeroje delecijų metodu ir su dirbtinėmis mielių chromosomomis nustatytos 3 nukleotidų sekos, kurių delecijos arba visiškai paverčia chromosomą acentriniu fragmentu, arba sutrinka tikslus chromatidžių paskirstymas dukterinėms ląstelėms. Šios sekos vadinamos **CDE** (anksčiau CEN). Dvi iš jų (CDE I ir CDE III) yra centromeros galuose, o viduryje yra 80–90 bp CDE II, kurioje gausu A–T porų (per 90%):

TCACATGAT GATATTTGAT TTTAT TATA TTTT T AAAAAAAGTAAAAAATAAAA
AGTGTACTA CTATAAACTAAAATAATAT AAAAA T T TT TTTCATTT T TTATTTT

CDE-I (CEN-I) **CDE II** (CEN II) 80–90 bp; >90% A+T
9 bp

AGTAG T T TATTTT TAAAAAATAAAAT T TAAAATAT T TCACAA AGATTT**CCG**AA
TCAT CAAATAAAAATTTT T TATTT T AAAT T T TATAAAGTGTTT TCTAAA**GGC**TT

CDE III (CEN III)
11 bp

CDE II sudaryta iš paprastųjų kartotinių sekų TTTTT/AAAAA. Panašiai ir aukštesniųjų eukariotų centromerose aptinkamos paprastosios kartotinės sekos.

CDE I ir CDE II mutacijos silpnina centromeros veiklą. Tuo tarpu įvykus mutacijai CDE III sekoje **CCG**, centromera tampa neveikli, tarytum būtų acentrinis fragmentas.

Aukštesniųjų eukariotų, tarp jų ir žmogaus, centromeros pamatą sudaro palydovinė DNR, bet ji yra ilgesnių sekų – α (alfoidinė) DNR. Viena tokia seka yra 171 bp. Bendras centromeros ilgis apie 3×10^6 bp. Net mielių *Schizosaccharomyces pombe* centromera yra kelių kb ilgio ir sudaryta iš kartotinių sekų.

Šiuo metu vyrauja dvi nuomonės:

- tarp kartotinių sekų įsiterpusios salelės nukleotidų sekų, su kuriomis savitai sąveikauja baltymai;
- alfoidinei DNR tenka centromeros funkcija, o nukleotidų sekos, su kuriomis sąveikauja baltymai, yra pačioje alfoidinėje DNR.

Labai svarbus tokios nuomonės įrodymas yra dirbtinės centromeros vien iš alfoidinės DNR. Dirbtinės žmogaus chromosomos su tokia centromera stabilios ir jungiasi su centromerai būdingais baltymais.

Alfoidinė DNR savitai sąveikauja su histonine nukleosomos šerdimi, todėl centromera yra pirminė chromosomos sąsmauka. Vienai alfoidinei DNR sekai tenka viena histoninė nukleosomos šerdis.

Kai kurios chromosomos neturi tikros centromeros. Paprastai tai nedidelės chromosomos, kaip antai drozofilos IV chromosoma. Achromatinės verpstės mikrovamzdeliai prie šios centromeros tvirtinasi įvairiose vietose, todėl tokios centromeros vadinamos **difuzinėmis**. Centromeros vaidmuo čia tenka heterochromatino mazgeliams.

Centromeros/kinetochoro baltymai. Esminės centromeros nukleotidų sekos iš pradžių buvo vadinamos CEN, todėl ir su centromeromis susiję baltymai pavadinti atitinkamai **CENP** (angl. *centromere protein*). Pagal atradimo eiliškumą buvo priduriama raidė: CENP-A, CENP-B, CENP-C... Tačiau daug baltymų, susijusių su centromera, žymimi kitaip.

Pagal paskirtį ir vietą visus centromeros baltymus reikėtų suskirstyti į tris grupes: baltymus, tiesiogiai kontaktuojančius su centromeros DNR, kinetochoro baltymus ir reguliacinius bei motorinius baltymus.

Baltymai, kurie tiesiogiai kontaktuoja su centromeros DNR. Jų žinoma keletas (INCENP, CENP-A, CENP-B, HMG-I/Y ir kt.). Antai baltymas CENP-B kontaktuoja su specifine nukleotidų seka (CENP-B bloku) alfoidinėje palydovinėje DNR:

5′-CTTCGTTGGAAACGGGA-3′.

Reguliacinę paskirtį turintis baltymas HMG-I/Y (angl. *high mobility group*, mažos mol. masės – 10 kDa) įsistato į mažąjį DNR griovelį.

Mielių centromeroje su CDE I seka jungiasi baltymas CBF-I (angl. *centromere binding factor*), o su CDE III – trijų baltymų kompleksas CBF-III ABC.

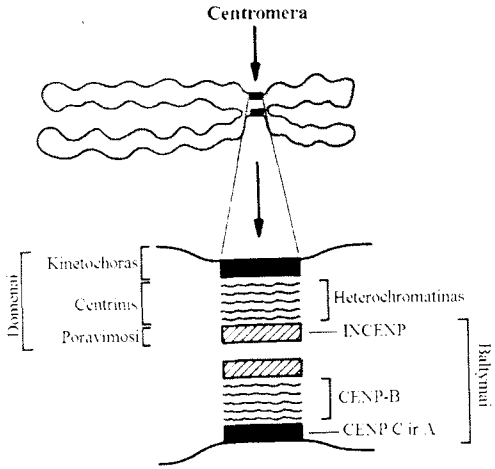
Tačiau daugelio šių baltymų tiesioginė paskirtis šiuo metu dar iki galo neišaiškinta. Antai CENP-B turi transpozazės savybių. Aiškesnė baltymo INCEP (angl. *inner centromere protein*) paskirtis. Šis baltymas turi dvejopą paskirtį: vienu metu jungia ir skiria chromatidžių centromeras. Šiam ryšiui nutrūkus, dukterinės chromosomos turėtų pajudėti polių link.

Kinetochoro baltymai. Achromatinės verpstės mikrovamzdeliai tiesiogiai su centromera nesąveikauja. Jie sąveikauja su kinetochorais, kurių yra du: vienas iš vienos pusės, antras – iš antros. Abu orientuoja chromosomą polių link. Į kinetochoro sandarą įeina mažiausiai 5 baltymai. Chromosomų eliminavimą tolimuosiuose somatinių ląstelių hibriduose irgi sąlygoja kinetochoro baltymai, kurie laipsniškai prarandami.

Reguliaciniai ir judėjimo baltymai. Jų irgi yra bent keletas. Vieni pastovūs, kiti keičiasi, nes centromera, kaip minėta, dalyvauja labai dinamiškuose, trumpalaikiuose reiškiniuose: chromosomoms judant ekvacinės plokštumos link, išsirikiuojant ekvacinėje plokštumoje, judant polių link.

Kai kurie iš minėtų baltymų dalyvauja ne viename reiškinyje ar struktūroje. Antai CENP-A ne tik tiesiogiai saveikauja su DNR, bet ir įeina į kinetochoro struktūrą. Baltymas INCEP dalyvauja ląstelės vyksme, kurio ryšys su centromeros funkcija yra labai netiesioginis. Tai vienas iš ankstyvųjų citokinezės baltymų. Jis sudaro kompleksą su ekvacinėje plokštumoje esančiais achromatinės verpstės mikrovamzdeliais. Taip pradeda formuotis plokštelė, dalijanti motininę ląstelę į dvi dukterines ląsteles.

Centromeros modelis. Centromerų judėjimą ir išsidėstymą ekvacinėje plokštumoje atlieka baltymai. Tačiau kaip jie sudaro visumą ir



3.24 pav. **Centromeros sandaros („sumuštinio") modelis**

veikia kaip vieningas darinys, kol kas nenustatyta. Bet tai viena iš intensyviausiai šiuo metu tiriamų chromosomos sandaros ypatybių.

Šiuo metu vyrauja **„sumuštinio" modelis** (3.24 pav.). Pagal jį chromatidžių centromeras vieną nuo kitos skiria INCEP baltymas, o komplekso išorėje iš abiejų pusių yra po baltyminį kinetochorą. Prie kinetochorų jungiasi mikrovamzdeliai.

Šis centromeros-kinetochoro sandaros modelis pakankamai pamatuotas. Gali keistis tik detalės.

3.5.3.3. Dirbtinės chromosomos. Eukariotų genų klonavimas ir genomo bibliotekos

Dirbtinės chromosomos konstruojamos kaip vektoriai (žr. p. 653) genų inžinerijoje:

- svetimiems genams perkelti į konkrečių eukariotų genomą biotechnologiniais sumetimais;
- klonuoti genus, sudaryti genomo bibliotekas, tirti klonuotų genų sandarą ir veiklą (ekspresiją).

Kaip vektoriai, dirbtinės chromosomos turi labai didelių privalumų. Svarbiausia, kad jos yra **labai talpios** svetimai DNR. Didžiausia seka, kuri įterpiama į mielių dirbtinę chromosomą **YAC,** yra net 300 kb ilgio. Į dirbtines chromosomas galima klonuoti **ilgus eukariotų genus**, kurių netalpina kiti vektoriai. Tai labai aktualu ir sudarant genomo bibliotekas. Antai visa drozofilos (*D. melanogaster*) genomo biblioteka sutelpa į mažiau kaip 2000 mielių dirbtinių chromosomų YAC.

Genomo biblioteka yra klonuotų fragmentų rinkinys, kuriame telpa viso genomo DNR sekos.

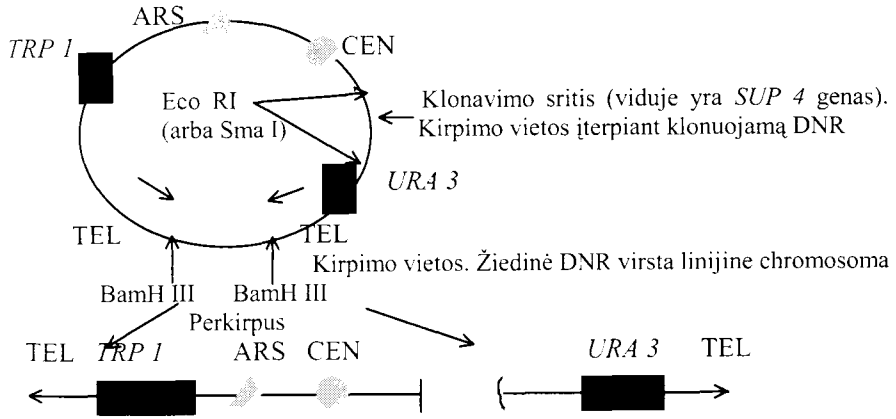
Eukariotų genams klonuoti ir genomo bibliotekoms sudaryti dažniausiai naudojamos mielių dirbtinės chromosomos YAC. Tuo tarpu genų sandarai ir veiklai, biotechnologiniais ir genų terapijos tikslais turi būti konstatuojamos konkrečių genomų dirbtinės chromosomos.

Dirbtinės chromosomos žymimos pagal organizmus, pvz., **YAC** (angl. *yeast artificial chromosome* – mielių dirbtinė chromosoma).

Dirbtinių chromosomų sandara. Dirbtinės chromosomos privalo turėti visas tris pagrindines chromosomos funkcines dalis: telomeras,

centromerą, replikatorių (*ori*, ARS). Visos šios dalys turi būti to organizmo, kurio dirbtinė chromosoma yra konstruojama. Tik tokia chromosoma prigis genome – vyks jos DNR replikacija, o DNR kopijos bus taisyklingai ir pastoviai paskirstomos. Priežastis neaiški, bet stabiliai paskirstomos tik pasiekusios tam tikrą ilgį dirbtinės chromosomos. Mielių – 20–50 kb.

YAC konstravimas, DNR klonavimas. Prieš įjungiant svetimą DNR, ši chromosoma dauginama kaip žiedinė plazmidė. Joje yra mielių ARS, centromera (CEN), 2 telomeros (TEL). Bet to nepakanka. Ši žiedinė plazmidė dar turi tris žymeklius, t. y. genus, nukleotidų sekas, kuriomis genetiškai pažymima chromosoma/DNR – *TRP1, URA3, SUP4*. Be to, būtinai yra trys nukleotidų sekos, kurias specifiškai pažįsta restriktazės. Tai endonukleazės, kurios kerpa DNR tik tam tikroje sekoje. Restriktazei BamH III perkirpus DNR, tuoj už telomerų esančioje sekoje, plazmidė virsta linijine chromosoma:



Perkirpus BamH III restriktaze, vienas žymeklis (*TRP1*) žymi kairįjį, antras (*URA3*) – dešinįjį segmentą. Klonavimo sritį žymi trečiasis žymeklis (*SUP4*), kuris, klonuojant svetimą DNR, prarandamas.

Klonavimo sritį kerpa tokia restriktazė, kuri padaro lipnius galus. Lygiai tokius pat lipnius galus ji padaro ir klonuojamojoje svetimoje DNR. DNR fragmentai lipniais galais atitinka vienas kitą. Juos sujungia DNR ligazės:

Tai bendras būdas **hibridinėms DNR molekulėms** gauti genų inžinerijoje. Žmogaus dirbtinė chromosoma gauta ir labai savotišku būdu. Ji pati susirinko ląstelėje iš į ją įterptų pavienių dalių: telomerų, centromeros, ori.

Šiuo metu sukurtos ir bakterijų dirbtinės chromosomos.

3.6. Somatinių ląstelių genomo ypatumai

Somatinės daugialąsčių organizmų ląstelės ir vegetatyvinės vienaląsčių organizmų ląstelės gali iš esmės skirtis nuo bazinių – nediferencijuotų ląstelių ne tik forma, sandara ir funkcija, bet ir genomo sandara.

Dažnai somatinėms ląstelėms būdingas vadinamasis **laikinasis paveldimumas** – pokyčiai, kurie išlieka šioms dalijantis mitozės būdu.

Tačiau reiškiniai, nagrinėjami šiame ir kai kuriuose kituose šio skyriaus poskyriuose, kaip **epigenetinis paveldimumas, genomo imprintingas ir pertvarka,** buvo netikėti, net sensacingi. Nepaisydama įtikinamų genetinių įrodymų, jų kurį laiką nepripažino oficialioji genetika. Herškovičius (I. Herskowitz), vieno iš įdomiausių genetikos vadovėlių autorius, savo knygoje (1966 m., rusų k. – 1968 m.) apie šiuos reiškinius išmintingai aprašė „Neišaiškintų reiškinių" skyriuje. Po kurio laiko šie reiškiniai „persikraustė" į kitus genetikos skyrius. Antai šiuo metu galima tik stebėtis, kad į šį skyrių buvo pakliuvusi geno konversija – vieno alelio virsmas kitu heterozigotose.

Pagaliau atėjo eilė ir **paramutacijoms, genotrofams** (žr. toliau). Šie reiškiniai buvo ignoruojami ne tik todėl, kad jie netilpo į tradicinės genetikos rėmus, bet ir todėl, kad jų atradimas istoriškai sutapo su lysenkizmo laikais. Formaliai šie reiškiniai lyg ir artimi T. Lysenkos požiūriui į paveldimumą ir kintamumą. Bet tik formaliai. Taigi dabar galima suprasti, kodėl kiekvienas toks „netelpantis į rėmus" genetinis reiškinys kėlė nuožmų genetikų nepasitenkinimą, ir atvirkščiai, džiaugsmą, jeigu bent laikinai pavykdavo reiškinį nuneigti. Taip atsitiko Kingo ir Brigso atradimui.

Branduolių persodinimo tyrimai. 1952–1954 m. Brigsas (R. Briggs) ir Kingas (T. J. King) sukūrė metodą, kaip perkelti varliagyvių branduolius iš somatinių ląstelių į neapvaisintus kiaušinėlius, kuriems prieš tai buvo pašalintas branduolys. Tyrimai atlikti su varle *Rana pipiens,* kurios kiaušinėlių branduolius labai patogu pašalinti mikropipete. Jie yra ne kiaušinėlio centre, kaip dažniausiai pasitaiko, o pakraštyje, todėl kiaušinėlio citoplazma mikropipete nepažeidžiama.

Brigso ir Kingo sukurtais branduolių persodinimo pamatais plačiai naudojamasi atliekant šiuo metu labai populiarius žinduolių klonavimo bandymus. Metodo esmė – branduolius perkelti į kiaušinėlius/ovocitus, t.y. į vienintelę ląstelę, iš kurios lengvai išauga visas organizmas (3.25 pav.). Net žinduolių genų inžinerijoje naudojamasi šia ovocitų ypatybe.

Brigsas ir Kingas pirmieji nustatė, kad diferencijuotose ląstelėse gali būti neįžiūrimi pro mikroskopą, bet **pastovūs branduolio pokyčiai**. Kai į bebranduolius ovocitus būdavo perkeliami branduoliai iš blastulės ląstelių, gemalai vystydavosi normaliai. Vadinasi, šios ląstelės genetiškai lygiavertės – **totipotencinės** (lot. *totalis* – visiškas, pilnutinis + *potentia* – galimybė, pajėgumas) generatyvinėms ląstelėms. Kitokios buvo gastrulės, gemalinių lapelių (ektodermos ir endodermos) ląstelės. Jų branduoliuose nustatyti pastovūs pokyčiai. Persodinus branduolius iš ektodermos arba endodermos, branduoliai nesivystė arba vystėsi su gana savitais ląstelių-branduolio donorų tipo nukrypimais.

Branduolio pokyčiai buvo tokie stabilūs, kad išliko po daug kartų pakartoto persodinimo (3.26 pav.) arba branduolių persodinimo iš transplantanto → į kitos rūšies varlių ovocitus → o iš šių dar kartą į *R. pipiens* ovocitus.

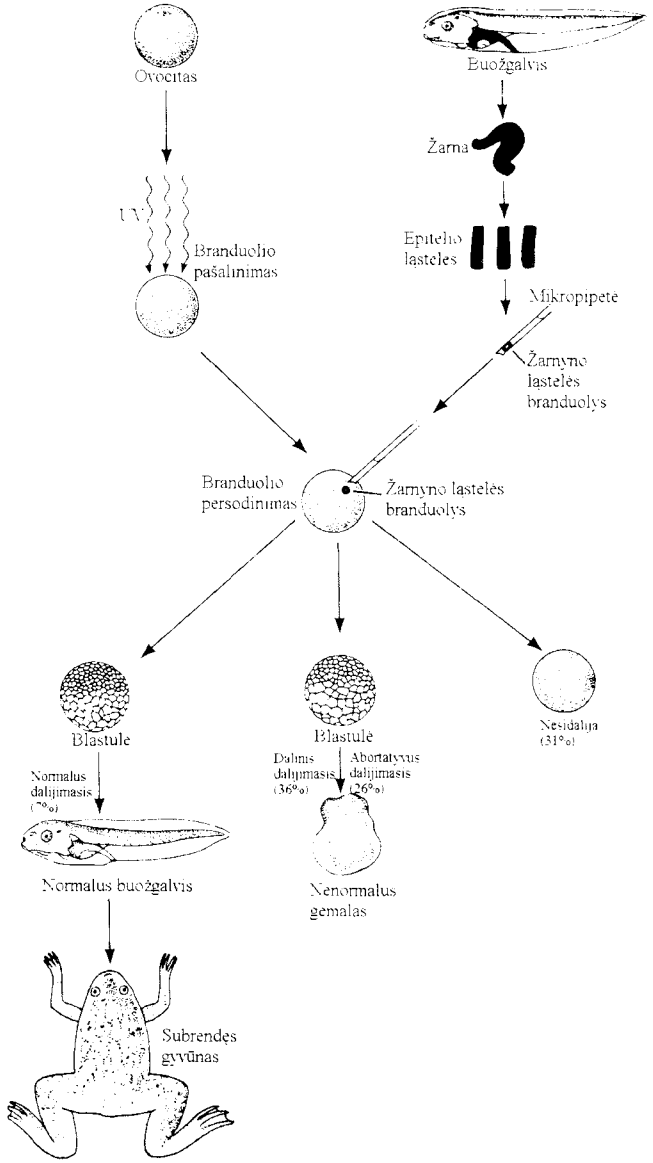
Pastovūs branduolio pokyčiai diferencijuotose ląstelėse prieštaravo nuostatai, kad visos ląstelės yra genetiškai lygiavertės. Todėl su pasitenkinimu buvo sutiktas Gardono (J. B. Gurdon) darbas. Jam pavyko, kaitaliojant bandymo sąlygas, išauginti normalias pentinuotas rupūžes (*Xenopus laevis*) perkėlus branduolius iš diferencijuotų žarnyno ląstelių. Vadinasi, šių ląstelių branduoliai yra genetiškai lygiaverčiai zigotai. Tačiau iš tikrųjų Gardono, Brigso ir Kingo tyrimų rezultatai beveik sutapo. Gauti trys rezultatai (3.25 pav.):

- išaugo normalios varlės,
- gemalai vystėsi nenormaliai,
- gemalai visiškai nesivystė.

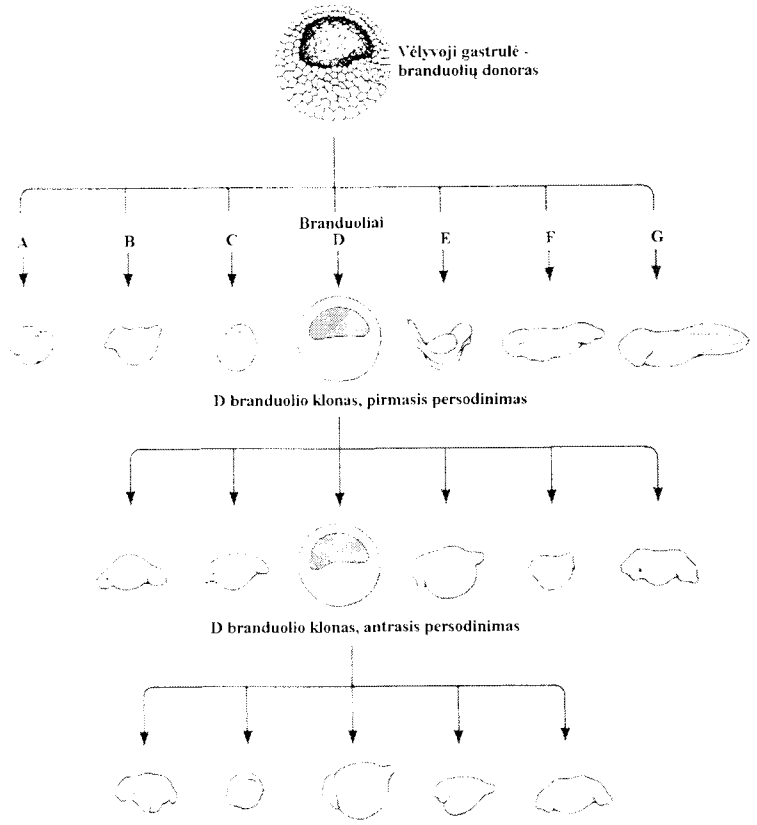
Skirtumas tik tas, kad Brigso ir Kingo bandymuose gemalai normaliai vystėsi tik perkėlus branduolius iš blastulės ląstelių, o perkėlus branduolius iš labiau diferencijuotų gastrulės ir gemalinių lapelių ląstelių, gemalai normaliai nesivystė.

Manoma, kad skirtumus lėmė dvi priežastys:

- buvo skirtingos varliagyvių gentys;
- Gardonas kaitaliojo bandymo sąlygas. Net ovocitų branduoliai buvo pašalinti kitokiu būdu, ne mikropipete, o suardyti apšvitinus ultravioletiniais spinduliais.



3.25 pav. **Branduolių persodinimas iš *Xenopus laevis* žarnyno epitelio ląstelių į neapvaisintus kiaušinėlius** (remiantis J. Gurdon, 1968):
ovocito branduolys pašalintas ultravioletine spinduliuote, normalus kiaušinėlio dalijimasis – 7%, iš jų tik 2,3% turėjo normalų raumenų atsaką; dalinis kiaušinėlio dalijimasis – 36%; abortyvus kiaušinėlio dalijimasis – 26%; nesidalijo – 31%



3.26 pav. **Stabilūs branduolio pokyčiai varlės *Rana pipiens* vėlyvosios gastrulės ląstelėse, nustatyti pakartotinio branduolių persodinimo būdu. Individuali branduolių įvairovė pagal epigenetinius pokyčius** (remiantis R. Briggs, 1956)

Šie abu skirtumai yra esminiai. Pirmiausia transplantuotuose branduoliuose net natūraliai vyksta dideli pokyčiai. Antai HeLa ląstelių branduoliai, perkelti į ovocitus, padidėjo 500 kartų. Srautas baltymų iš citoplazmos traukia į transplantuotą branduolį. Per 75% buvusių branduolio baltymų pakeičiami naujais. Todėl galima padaryti dvi išvadas: **Pirma**,

- iš diferencijuotų ląstelių į ovocitus perkeltame branduolyje vyksta sudėtingi pokyčiai;
- keičiant sąlygas, galima pakeisti šių pokyčių pobūdį – ir dediferenciacijos (grįžimo) kryptimi.

Antra, regeneracija nevienodai sėkminga įvairiuose organizmuose. Tai nustatyta augaluose. Augalai regeneruoja lengviau, bet ir jų regenerantai nevienodai lengvai gaunami. Plati augalų amplitudė nuo tabako (*Nicotiana tabacum*) ar vairenio (*Arabidopsis thaliana*), kurių regenerantai iš atskirų ląstelių gan lengvai gaunami, iki varpinių augalų – miežių, kviečių, ryžių. Bet, kaip ir Gardono bandymuose, buvo parinktos bandymo sąlygos, kuriomis gauti ir varpinių augalų regenerantai. Augalų tyrimai parodė, kad **regeneracijos sėkmė priklauso ir nuo visai menkučių skirtumų.** Lemtingi gali būti ne tik skirtumai tarp genčių/rūšių ar veislių/genetinių linijų, bet ir tarp tos pačios linijos pavienių augalų. Tai neturėtų stebinti, nes įvairovė būdinga somatinėms ląstelėms, iš kurių gaunami regenerantai.

Somatinių ląstelių populiacijos. Kad somatinės ląstelės skiriasi nuo meristeminių augalo ląstelių genotipais, dar 1919 m. įrodė vokiečių mokslininkas Vinkleris (H. Winkler). Jis daug kartų šalino pomidorų ūglius ir tokiu būdu privertė pumpurus susidaryti ne iš meristemos, o iš giluminių somatinių ląstelių (vadinamuosius pridėtinius, adventyviuosius pumpurus). Tarp išaugusių ūglių aptikta poliploidų, kurie turi kelis chromosomų rinkinius.

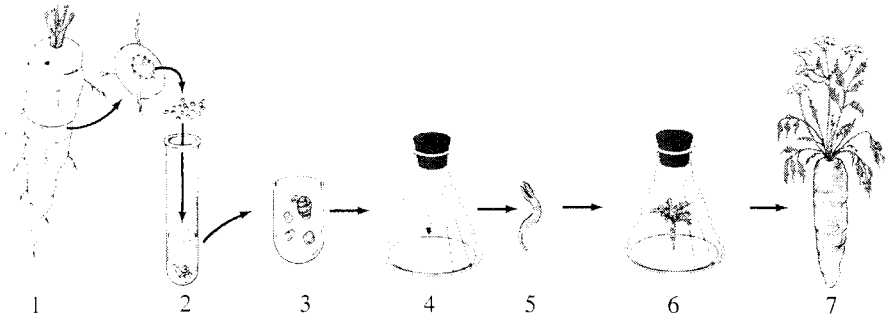
Dar ryškiau somatinių ląstelių genotipų įvairovę įrodė 1931 m. T. Asejeva. Naudodamasi panašia metodika kaip Vinklerio, ji išchimerino bulvių gumbus. Iš adventyvinių pumpurų išaugę ūgliai ir bulvių gumbai buvo labai įvairūs pagal daugelį tirtų požymių (gumbų dydį, spalvą, formą ir kt.). Skirtumai buvo paveldimi. Vadinasi, bulvių gumbuose to paties audinio ląstelės yra skirtingų genotipų, sudaro **populiaciją** (lot. *populus* – liaudis, minia).

Branduolių persodinimo tyrimais papildomai buvo įrodyta, kad

somatinės ląstelės sudaro populiaciją ir pagal branduolio pokyčius, kurie vyksta ląstelėms diferencijuojantis.

Antai nors iš *Rana pipiens* gastrulės ląstelių, perkėlus branduolius į ovocitus, visi gemalai vystėsi nenormaliai, bet pagal išsivystymo lygį jie labai skyrėsi (žr. 3.26 pav.).

Somatinių ląstelių totipotenciškumui įrodyti labai dažnai vis dar remiamasi augalų regeneracijos tyrimais. Antai iš vienos morkų šaknų floemos ląstelės galima regeneruoti visą augalą (3.27 pav.). Šis savo požymiais sutaps su morkos – ląstelės donoro savybėmis.



3.27 pav. **Augalo somatinės ląstelės totipotenciškumas – morkos klonavimas iš vienos somatinės ląstelės:**
1 – pradinės morkos šaknis; *2–3* – somatinės ląstelės mitybinėje terpėje; *4–5* – embrioidas; *6–7* – regenerantas

Toks augalų dauginimo būdas vadinamas **klonavimu** (gr. *klon* – šakelė, ūglys, atžala). Jis svarbus praktiškai, nes juo galima greitai padauginti augalus.

Vieno individo (augalo) palikuonys, dauginami nelytiniu būdu ar iš somatinių jo ląstelių, sudaro **kloną.** Jį sudaro ir somatinės ląstelės, kilusios iš vienos motininės ląstelės. **Ląstelių klono dydis** priklauso nuo to, kiek kartų pradinė, motininė ląstelė dalijosi.

Visais atvejais vadovaujamasi taisykle, kad **visi klonuoti individai bus to paties genotipo, kaip ir motininis individas ar ląstelė.** Klonuojant išsaugomas ir heterozigotinis ar homozigotinis genų derinys, kuris keičiasi dauginant lytiniu būdu (žr. p. 584). Dėl šios priežasties stengiamasi klonuoti net medžius (pušis, egles), kurie paprastai vegetatyviniu būdu nesidaugina, norint išsaugoti gerąsias vadinamųjų „pliusinių“ medžių savybes, tiksliau, palankų šių augalų genų derinį.

Tačiau klonuojant neišvengiama somatinių ląstelių genotipų įvairovės, tik nesąmoningai atranka atliekama pagal teigiamą rezultatą, kad tik būtų gautas normalus regenerantas.

Tačiau šiuo metu įrodyta, kad ir pagal gebėjimą regeneruoti somatinės augalų ląstelės yra populiacija. Vienos ląstelės normaliai regeneruoja, ir regenerantų savybės puikiai sutampa su augalo-ląstelės

donoro savybėmis. Iš kitų to paties audinio ląstelių regeneracija visiškai nevyksta, o iš trečių išauga pakitę regenerantai. Pasireiškia vadinamasis **somatokloninis kintamumas** – paveldima regenerantų įvairovė.

Kad ir kaip kistų somatinės ląstelės (žr. toliau), išsaugoma dalis ląstelių be šių pokyčių, t. y. šios lieka totipotencinės. Jos yra rezervas naujų pokyčių, kurie būtini prisitaikyti prie naujų aplinkos veiksnių arba pradėti naują diferenciacijos ciklą. Taigi somatinės ląstelės sudaro populiaciją nuo nepakitusių ląstelių iki ląstelių, kurių genomas negrįžtamai pakitęs, t. y. negrįžtamai diferencijuotų, netekusių totipotenciškumo ląstelių.

Pakitusių ir nepakitusių ląstelių santykis įvairiuose organuose ir audiniuose skirtingas. Antai vairenio (*Arabidopsis thaliana*) rozetiniuose ir viršutiniuose lapuose, stiebe ir sėklaskiltėse labai didelė ploidiškumo įvairovė – nuo 2 iki 32 C (čia C – DNR kiekis haploidiniame genome). Tuo tarpu žiedynų ląstelėse nustatytas absoliutus diploidiškumas.

Be to, somatinių ląstelių populiacijoje įvairiu santykiu pasiskirsto ląstelės su **grįžtamaisiais** ir **negrįžtamaisiais genomo pokyčiais**. Tai priklauso nuo genomo pokyčių pobūdžio.

Pastaruoju metu labai populiarus žinduolių klonavimas. Diploidinis branduolys iš somatinės ląstelės perkeliamas į kiaušialąstę, kuriai prieš tai pašalintas branduolys. Matyt, klonavimo sėkmę lemia aukščiau aptartos somatinių ląstelių genomo ypatybės:

- somatinės ląstelės sudaro populiaciją nuo totipotencinių iki negrįžtamai praradusių potenciją ląstelių;
- ląstelės iš įvairių audinių ir organų nevienodai praradusios genetinę potenciją.

Štai, matyt, kodėl sėkmingai klonuojami branduoliai iš gyvulių tešmens ląstelių.

Genomo pokyčių somatinėse ląstelėse pobūdis. Skiriami trys somatinėse ląstelėse vykstančių genomo/genų pokyčių, tipai:

- chromatino ir genų veiklos pokyčiai, pastovūs toje ląstelėje, kurioje jie įvyko, bet **nepaveldimi dukterinių ląstelių;**
- **epigenetiniai** (gr. *epi* – po+*genesis* – kilmė) pokyčiai, kai mitoziškai ir/arba mejoziškai paveldimi genomo/geno pokyčiai nekeičia DNR nukleotidų sekų;
- **genomo pertvarka,** kai somatinių ląstelių pokyčius sąlygoja grįžtamieji arba negrįžtamieji DNR nukleotidų sekų pokyčiai.

Visais trimis atvejais pokyčiai gali būti **grįžtamieji** ir **negrįžtamieji**. Pastaruoju atveju prarandamas totipotenciškumas.

Pirmojo tipo pokyčiai vyksta dėl daugelio priežasčių (žr. IV sk.); viena jų – ilgalaikės mRNR. Pavyzdys gali būti ilgalaikės hemoglobino mRNR. Hemoglobinas yra savitasis audinių baltymas. Jis yra tik retikulocituose ir eritrocituose. Kitose organizmo ląstelėse jo nėra.

Hemoglobino sintezė vyksta retikulocituose, bet juose nevyksta mRNR sintezė. Naudojamasi mRNR, kuri buvo susintetinta gerokai anksčiau – bazofiliniuose eritroblastuose iki hemoglobino sintezės retikulocituose. Dar įdomiau tai, kad žinduolių retikulocituose įvyksta negrįžtamoji genomo pertvarka: jie netenka branduolio, nes jis suyra. Taigi retikulocitai kategoriškai užprogramuoti tik vienam baltymui – hemoglobinui sintetinti.

Kamieninės ląstelės, iš kurių vystosi eritrocitai, turi visą genetinę informaciją. Įvykių grandinė tokia:

kamieninės ląstelės turi visą genetinę informaciją → proeritroblastai → **bazofiliniai eritroblastai** vyksta ilgalaikių mRNR sintezė → **retikulocitai** vyksta hemoglobino sintezė, žinduoliai **praranda branduolį,** t.y. **gebėjimą dalytis ir sintetinti mRNR** → **eritrocitai** galutinai diferencijuotos ląstelės, atlieka savo gyvybinę paskirtį (funkciją)

Po genomo pertvarkos retikulocitai „pasmerkti“ sintetinti tik hemoglobiną, o suirę branduoliai visiškai uždraudžia diferencijuotoms ląstelėms sugrįžti į pradinę nediferencijuotų ląstelių būseną.

3.7. Epigenetiniai genomo pokyčiai ir paveldimumas

Šiai reiškinių grupei priklauso **pokyčiai, kurie paveldimi ląstelėms dalijantis mitozės ir/arba mejozės būdu. Esminė šių pokyčių ypatybė – DNR nukleotidų seka nesikeičia**. Be to, epigenetiniai pokyčiai yra

tikslingi: ar žymėti motinos bei tėvo genomus (žr. genomo imprintingas), ar suvienodinti genų dozę (X chromosomos virtimas Baro kūneliu), ar susiję su ląstelės specializacija ir diferenciacija.

3.7.1. Genomo imprintingas

Terminas atklydęs į genetiką iš psichologijos, gyvūnų elgsenos. Tai įsiminimas, „atspaudas" (angl. *imprint* – žymė, pėdsakas, atspaudas, įspausti, antspauduoti, palikti gilų pėdsaką, įsmigti atmintyje), patirtis, kuri įgyta vaikystėje ir išsaugota visą gyvenimą, dažnai netikėtai iškylanti. Taip pat pri(si)rišimas vaikystėje prie konkrečių individų – irgi išliekantis ilgą laiką, gal ir visą gyvenimą.

Šis ilgas paaiškinimas gana gerai nusako esmę reiškinių, kurie ir genetikoje vadinami imprintingu:

- genomo imprintingas,
- genų veiklos (valdymo) imprintingas.

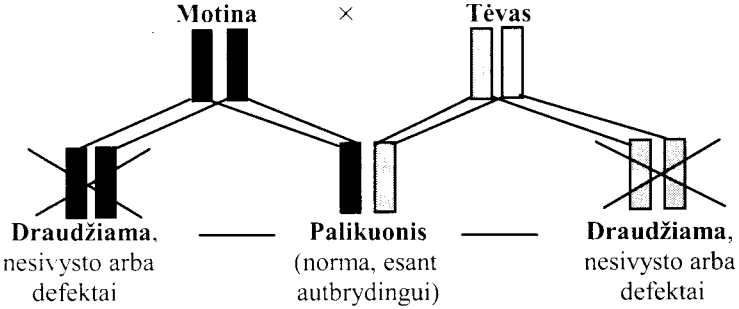
Pastarasis reiškinys kartais vadinamas **ląstelės atmintimi**.

Genomo imprintingo apibūdinimas. Šis epigenetinis reiškinys atrastas tik 1988–1990 m.

Genomo imprintingas – tai atmintis, žymė, iš ko palikuonis yra paveldėjęs chromosomą: iš tėvo ar iš motinos. Žymėjimas atliekamas tėvo ar motinos generatyvinėse ląstelėse, bet žymėjimo būdas DNR nukleotidų sekų nekeičia.

Genomo imprintingas aptiktas įvairiose eukariotų grupėse: žinduoliuose, vabzdžiuose, augaluose, net mielėse. Tad jis yra būdingas organizmams, kurių lytis diferencijuota į vyrišką ir moterišką, ar apskritai į lytinius tipus, bet dauginimosi būdas yra **autbrydingas**: susilieja dviejų individų lytinės ląstelės. Aukštesniųjų eukariotų, kurie dauginasi autbrydingo būdu, palikuonys vieną haploidinį chromosomų rinkinį – genomą paveldi iš motinos, o kitą iš tėvo. Tai naudinga, nes susidaro didesnė genų, taigi ir organizmų įvairovė, polimorfizmas. Tad šiam dauginimosi būdui buvo palanki atranka.

Genomo imprintingas istoriškai atsirado kaip draudimas susilieti savo paties lytinėms ląstelėms. Kiekvienoje homologinių chromosomų poroje viena chromosoma turi būti motinos, antra – tėvo. Kai ši tvarka pažeidžiama, būna negyvybingi ar nenormalūs palikuonys.



Imprintingo reikšmė tuo neapsiriboja. Tai vienas iš būdų genų veiklai valdyti, ypač ankstyvojoje embriogenezėje. Šiuo raidos etapu tėvo genai būna neaktyvūs, veikia tik motinos genai.

Matyt, ir eukariotams genomo imprintingas nėra universalus reiškinys. Neaišku, kaip jis pasireiškia tuose organizmuose, kurie patys apsivaisina, t. y. veisiasi įvaisos (inbrydingo) būdu – yra hermafroditai gyvūnai ar savidulkiai augalai. Šiuo atžvilgiu dar įdomesni organizmai, kurių autbrydingas kaitaliojasi su hermafroditizmu (drugiai, nematodas *Caenorhabditis elegans* ir kt.). Paradoksalu, bet šių organizmų genomo imprintingas visiškai netyrinėtas. Ir apskritai kol kas daugiausia tiriami tik žmogus ir žinduoliai. Taip yra dėl genomo imprintingo svarbos medicinoje ir žinduolių biotechnologijoje.

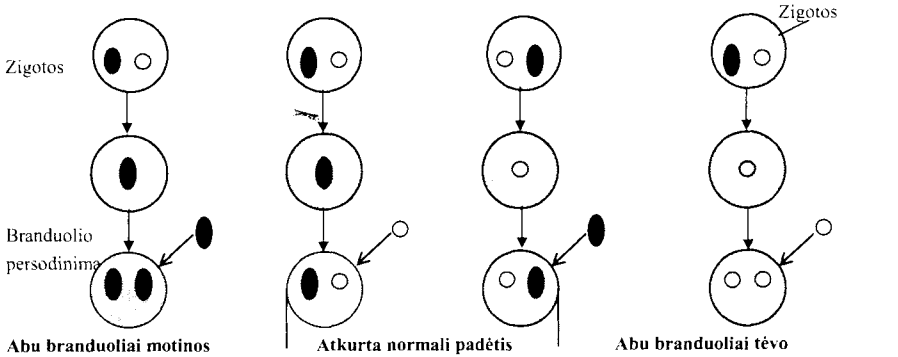
3.7.1.1. Genomo imprintingo tyrimo metodai ir įrodymas

Genomo imprintingas įrodytas ir nustatomas trimis būdais:

- branduolio persodinimo,
- aneuploidijos (heteroploidijos),
- chromosomų mutacijų (dažniausiai delecijų).

Kiekvienas iš šių būdų savaip išryškina genomo imprintingo reikšmę: pirmuoju atveju – viso genomo, antruoju – pavienių, konkrečių chromosomų, trečiuoju – konkrečių lokusų (genų).

Branduolio persodinimas. Metodo esmę sudaro būdas atskirti motinos ir tėvo branduolį zigotoje. Pasinaudota tuo, kad po apvaisinimo žinduolių (pelių) zigotoje kiaušaląstės (motinos) ir spermatozoido (tėvo) branduoliai kurį laiką nesusilieja. Branduolius galima atskirti pagal dydį ir formą. Taigi iš vienų zigotų pašalinamas motinos, iš kitų – tėvo branduolys. O toliau galima pasielgti įvairiai:



Abu branduoliai motinos **arba** visai nesivysto, **arba** gemalai beveik normalūs, bet silpnai išsivystę placenta ir trynio maišas

Atkurta normali padėtis tėvo+motinos branduoliai - ideali kontrolė **normalūs gemalai**

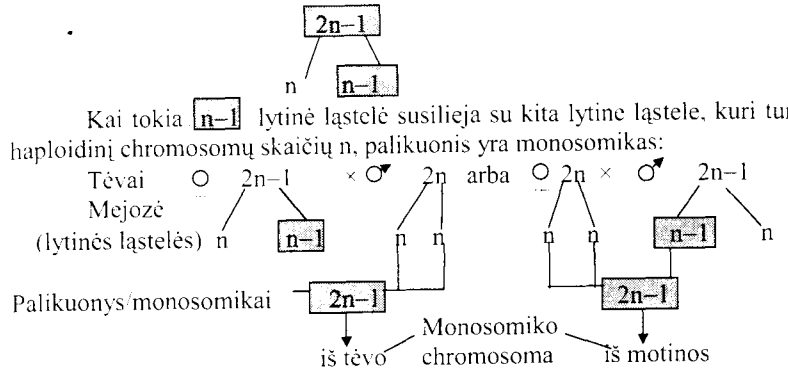
Abu branduoliai tėvo **arba** visai nesivysto, **arba** gemalas silpnai išsivystęs, o placenta ir trynio maišas beveik normalūs

Normaliai žinduolio raidai palikuonis turi turėti vieną genomą iš motinos, o kitą iš tėvo.

Aneuploidija (heteroploidija) yra genomo mutacijos, kai pakinta pavienių chromosomų skaičius. Genomo imprintingui tirti pasinaudojama arba monosomija (tik viena chromosoma vietoj poros), arba **disomija** (tuo atveju, kai abi homologinės chromosomos yra arba tik motinos, arba tik tėvo). Pastarojo tipo pokytis anksčiau, iki atrandant genomo imprintingą, net nebuvo laikomas mutacija (žr. toliau). Genomo imprintingui tirti specialiai kuriamos eksperimentinių gyvūnų monosominės, sukibusių chromosomų, su Robertsono translokacijomis linijos.

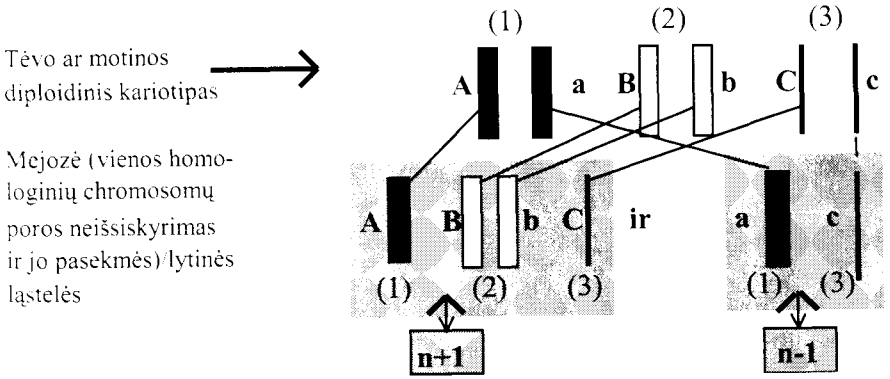
Monosomija – tai toks aneuploidijos tipas, kai trūksta vienos chromosomos. Organizmas, kuriam trūksta chromosomos, vadinamas **monosomiku**.

Jeigu monosomikas vaisingas, pusė jo lytinių ląstelių yra n–1 kariotipo, o kita pusė – normalių haploidinių:



Abiem atvejais nustatyta genomo imprintingo tvarka yra pažeista. Viena chromosoma yra tik tėvo arba motinos. Todėl vien dėl to turi būti nukrypimai nuo normalios raidos/fenotipo. Nenormalų monosomikų fenotipą (žr. p. 422) nulėmė pažeisto genomo imprintingas. Tačiau tai išaiškinti ne taip paprasta.

Gyvybingi ir vaisingi žmogaus monosomikai yra tik kai kurių chromosomų, be to, reti. Taigi tikimybė, kad monosomikas turės palikuonių, yra labai maža. Dažniau monosomikai ir apskritai aneuploidai gimsta normalaus kariotipo tėvams. Mejozėje neišsiskiria homologinių chromosomų pora, ir abi homologinės chromosomos pakliūva į vieną lytinę ląstelę:



Neišsiskyrus chromosomų porai, po lygiai atsiranda n+1 ir n–1 kariotipų lytinių ląstelių. Pastarajai susiliejus su normalaus kariotipo lytine ląstele n, palikuonis yra monosomikas, paveldėjęs tik vieno tėvų chromosomą.

Daugelis žmogaus ir kitų žinduolių monosomikų žūva dar negimę. Genomo imprintingas verčia domėtis ir šių (iš persileidimų) gemalų fenotipais – kokius nukrypimus nuo normalaus fenotipo jie turi.

Sunkiausia nustatyti, kieno – tėvo ar motinos – chromosomą paveldėjo monosomikas. Tiriamoji chromosoma turi būti žymima citologiškai arba genetiškai. Tyrimams naudojamos gyvūnų (dažniausiai pelių) **specialios linijos,** kurias galima dirbtinai sukurti.

- **Genetiškai** chromosomos žymimos dominuojančiais genais, kurių lemiami požymiai nesunkiai nustatomi fenotipe.
- **Citologiškai** chromosomos žymimos matomais chromosomų sandaros pokyčiais.

Antai pelių genomo imprintingui tirti sukurtos pelių linijos su sukibusiomis kai kuriomis chromosomomis. Žymėtoji chromosoma lengvai aptinkama.

Prisiminkime, kad aneuploidijos metodu nustatoma, ar genomo imprintingas būdingas konkrečiai chromosomai. Pvz., pelės, abi 11-ąsias chromosomas paveldėjusios iš motinos, buvo smulkios, paveldėjusios abi 11-ąsias chromosomas iš tėvo, – gerokai stambesnės už normalias peles, kurių viena 11-oji chromosoma buvo iš motinos, o antra – iš tėvo.

Kai yra genomo imprintingas, monosomikai, paveldėję chromosomą tik iš motinos arba tik iš tėvo, skiriasi požymiais, fenotipu.

Chromosomų mutacijų metodas. Chromosomų mutacijomis **nustatomas konkrečių lokusų/genų imprintingas**. Šiam tikslui pasinaudojama įvairiomis chromosomų mutacijomis, bet dažniausiai – delecijomis.

Genomo imprintingas aptinkamas tais atvejais, kai vienoje iš homologinių chromosomų yra delecija, o kita chromosoma normali. Joje segmentas neiškritęs, t. y. delecija yra heterozigotinėje padėtyje:

A B C D E F G H – normali chromosoma

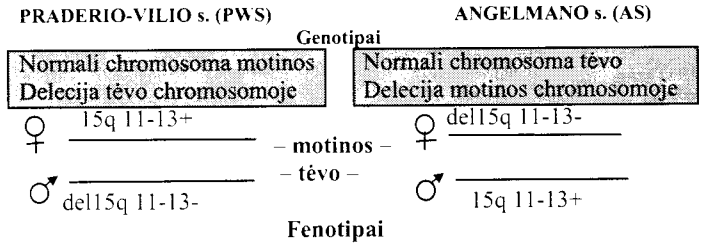
A B E F G H – **CD** segmento delecija

Delecijos pasireiškia kaip *nul*-mutacijos. Bet kai delecija yra lokuso, kuriam būdingas genomo imprintingas, labai svarbu, kieno – motinos ar tėvo – yra išlikusi normali chromosoma su neiškritusiu segmentu.

Klasikiniu ir modeliniu pavyzdžiu tapo **du žmogaus sindromai – Praderio-Vilio (Prader-Willi, PWS) ir Angelmano (AS).** Abu jie atsiradę dėl tos pačios delecijos žmogaus 15-ojoje chromosomoje. Iškritę 15-osios chromosomos ilgojo peties 11–13 segmentai. Delecija žymima del15q11–13– (delecijos žymimos po segmento rašant minuso ženklą).

Sindromai skiriasi:

- genotipu, iš ko, tėvo ar motinos, yra normali chromosoma;
- fenotipu.



Disomija su genomo imprintingo pažaidomis. Pasitaiko, kad PWS ar AS fenotipų asmenys yra normalaus kariotipo, nors jų fenotipas šiek tiek skiriasi nuo to, kuris būdingas, kai PWS arAS yra dėl delecijos 15q11–13–.

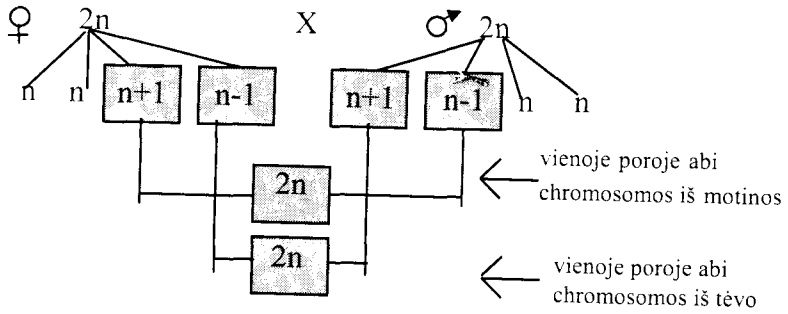
Taip gali būti dėl dviejų priežasčių:

- gali pakisti genų imprintingo pobūdis (pvz., dėl genomo imprintingą valdančių genų mutacijų);
- nors kariotipas yra normalus, abi chromosomos iš tėvo ar motinos.

Kaip gali atsirasti toks kariotipas?

Kaip minėta, mejozėje neišsiskyrus homologinių chromosomų porai, po lygiai susidaro lytinės ląstelės su abiem homologinėmis

chromosomomis n+1 ir lytinės ląstelės, kurios neturi šios chromosomos, būtent n–1. Kai susilieja viena nenormalaus kariotipo n+1 lytinė ląstelė su kita nenormalaus kariotipo n–1 ląstele, palikuonis turi normalų diploidinį kariotipą:



Bet taip yra tik formaliai. Iš tikrųjų tokių **disomikų** pažeistas genomo imprintingas – abi chromosomos arba motinos, arba tėvo. Net jeigu tokie asmenys neturi ryškių sindromų požymių, jie liguisti, silpnos sveikatos, ryškus polinkis susirgti vėžiu.

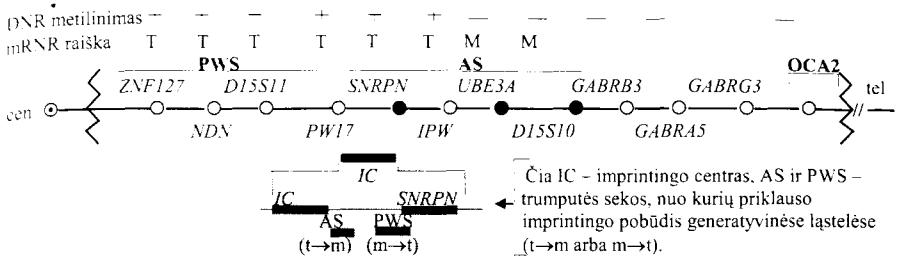
3.7.1.2. Genomo imprintingas ir alelinių genų veiklos ypatumai. Imprintingo esmė

Žymimi konkretūs lokusai. Delecijų metodu buvo įrodyta, kad žymimas ne visas genomas, o tik kai kurie lokusai. Šiuose lokusuose yra nuo vieno iki kelių genų.

Manoma, kad žmogaus genome yra apie 200 žymėtųjų, imprintingo lokusų.

Minėtuose 15q11–13 segmentuose (apie 800 kb), nuo kurių priklauso, ar bus Angelmano ar Praderio-Vilio sindromai, yra keletas genų, tarp jų *GABR* sankaupa (iš trijų genų, koduoja 8-aminobutano A tipo receptoriaus subvienetus), genas *SNRPN* (angl. *small nuclear riboprotein polypeptide*). Pastarasis koduoja vienos mažosios branduolio RNR (mbRNR) baltymo vieną iš polipeptidų. Normalaus kariotipo asmenų veikia tik vienas *SNRPN* geno, būtent tėvo, alelis. Chromosomoje, kuri paveldėta iš motinos, alelis neveiklus. Specialiai sukurtoje pelių linijoje, kuri turėjo abu *SNRPN* alelius iš motinos, šis genas apskritai neveikė.

Kaip priešingybė jam yra kitas genas ***UBE 3A***, kuris lemia ubikvitinproteinligazę ir veikia tik šio geno alelis, paveldėtas iš motinos. Alelis, paveldėtas iš tėvo, yra neveiklus. Visas lokusas atrodo taip:



Panašus genų duetas aptiktas ir 11-ojoje žmogaus chromosomoje. Šios chromosomos trumpojo peties 15 segmento (del11p15–) delecija sukelia paveldimą (šeiminį) **Vilmso** vėžį. Tai piktybinis inkstų auglys, kuris atsiranda vaikams iki 3-jų metų amžiaus. Lokuse irgi yra keli genai, tarp jų du genai, kurie skirtingu būdu žymėti motinos ir tėvo chromosomose: *IGF2* ir *H19*. ***IGF2*** (angl. *insuline-like growth factor II*) genas koduoja vaisiaus (fetalinį) mitogeną. Mitogenai – tai medžiagos, kurios sukelia pirmą impulsą ląstelei dalytis (iš čia ir jų pavadinimas kilęs iš mitozės). *IGF2* genas yra žymėtasis. Iš dviejų šio geno alelių, kurių vienas paveldėtas iš motinos, o kitas iš tėvo, išsivysčiusioje placentoje veikia tik vienas alelis, tik tas, kuris **paveldėtas iš tėvo**. Tame pačiame žymėtajame lokuse yra kitas žymėtasis genas ***H19***, kurio iš dviejų paveldėtų alelių **veikia tik motinos alelis**.

Genomo imprintingas ir aleliniai genai. Genomo imprintingas yra esminis nukrypimas nuo Mendelio, ypač 1-ojo – dominavimo, dėsnių. Paprastai homologinėse diploidinio organizmo chromosomose yra arba po tokį patį alelį (yra homozigota) arba po skirtingą alelį (yra heterozigota). Klasikiniu atveju homozigotose abu tapatūs genai veiklūs, o heterozigotose pasireiškia tik vienas alelis – dominuojantis. Antrasis alelis – recesyvusis gana dažnai yra neveiklus (*nul*-mutacija) arba apskritai jo nėra.

Genomo imprintingas sukuria **skirtumus tarp visiškai tapačių genų** – to paties geno tikslių kopijų:

- du visiškai tapatūs genai sąveikauja taip, lyg būtų du skirtingi aleliniai genai;
- turėtų pasireikšti abiejose homologinėse chromosomose esantys visiškai tapatūs genai, tuo tarpu veikia tik vienas genas;
- autosomose (nelytinėse chromosomose) esančių genų veikla priklauso nuo lyties (kas tėvas, motina); klasikiniu atveju tai būdinga tik tiems genams, kurie yra lytinėse chromosomose.

Gal pagaliau ir amerikiečiai pripažins, kad yra ne du, o trys Mendelio dėsniai. Jie nuo Morgano laikų tvirtina, kad yra tik du Mendelio dėsniai: skilimo ir nepriklausomo požymių paveldėjimo. Lyg genų sąveika, dominavimas nebūtų genetiniai reiškiniai. Faktiškai jie tai jau daro.

Imprintingo esmė. Genomo imprintingas padaro du visiškai tapačius genus skirtingais aleliniais genais. Bet skiriasi ne nukleotidų sekos. Jos išlieka pastovios ir nesiskiria. **Skirtingai modifikuojami DNR ir chromatinas.**

Monoalelinė ir bialelinė ekspresija (raiška). Kaip minėta, genomo imprintingas pakeitė mūsų požiūrį į alelinių genų veiklą. Klasikiniu atveju veikia abu tapatūs genai, esantys homologinėse chromosomose. Dėl imprintingo veiklus yra tik vienas alelis. Be to, pasirinktinai – motinos ar tėvo. Taigi yra:

- **bialelinė raiška,** kai veikia abiejose homologinėse chromosomose esantys aleliai;
- **monoalelinė raiška**, kai veikia tik vienoje iš homologinių chromosomų esantis alelis, be to, priklausomai nuo to, iš ko alelis paveldėtas: iš tėvo ar iš motinos. Kitoje homologinėje chromosomoje jis yra neveiklus.

Žmonių ligas, nenormalų fenotipą gali nulemti sutrikusi monoalelinė raiška. Užuot veikęs vienas alelis, veikia abu aleliai. Jo raiška tampa bialeline. Antai apie 50% leukemijos atvejų būna dėl jau ne kartą minėto *IGF2* geno bialelinės raiškos. Pasigamina per daug mitogeno, todėl pradeda neprogramuotai dalytis somatinės ląstelės. O tai ir yra vėžio priežastis. Nustatyta, kad bialelinė *IGF2* geno raiška gali lemti ne tik Vilmso vėžį, bet ir abdomiosarkomą ir kitas vėžio formas. Kitų šio lokuso genų bialelinė raiška (vietoj monoalelinės) sukelia Bekvito-Vydemano (Bechwith-Wiedemann) sindromą (itin stambus vaisius, vėžys), šeiminį širdies defektą – LQT (angl. *long QT*) sindromą ir kt.

Bialelinė raiška – nežymėtiesiems (klasikiniams) genams yra normali būsena; žymėtiesiems genams – imprintingo pažaida.

Tam pačiam genui vienuose organizmuose būdinga bialelinė ekspresija, kituose – monoalelinė ekspresija. Pastaruoju atveju pasireiškia genomo imprintingas. Taip yra *MGP/IGF2R* genui. Jis koduoja baltymą, kuris yra *IGF2* mitogeno represorius, slopina mitogeno veiklą. Pelių genome šio geno ekspresija yra monoalelinė (taigi jis yra žymėtasis). Žmogaus genome vienodai veiklūs abu aleliai (bialelinė ekspresija). Alelinių homologų veiklos pobūdis keičiasi ir įvairiuose organuose, audiniuose, raidos etapuose. Antai 6–8 savaičių placentoje veikia abu genų *IGF2* ir *H19* aleliai. Išsivysčiusioje placentoje abiejų genų ekspresija buvo monoalelinė. Choriokarcinomos ląstelėse dažnai būna bialelinė šių genų veikla.

Pasirinktinis DNR metilinimas lytinėse ląstelėse. Kol kas metilinimas yra vienintelis ištirtas genomo imprintingo būdas. Daugelis DNR rajonų pasirinktinai metilinami po apsivaisinimo. Genomo imprintingas tuo ir skiriasi, kad **pasirinktinai metilinama DNR bręstant lytinėms ląstelėms** ir **metilinimo pobūdis po apvaisinimo paveldimas palikuonio ląstelių.** Metilinami tie genai, kurie turi metilinimo vietas, dažniausiai 5′ dalyje CpG saleles arba CNG.

Bręstant naujoms lytinėms ląstelėms, diferencijuotose ląstelėse gal ir anksčiau, genomo pasirinktinio žymėjimo pobūdis išnyksta, o jo vietoje lytinių ląstelių genomai žymimi iš naujo (3.28 pav.). Šis ciklas kartojasi iš kartos į kartą.

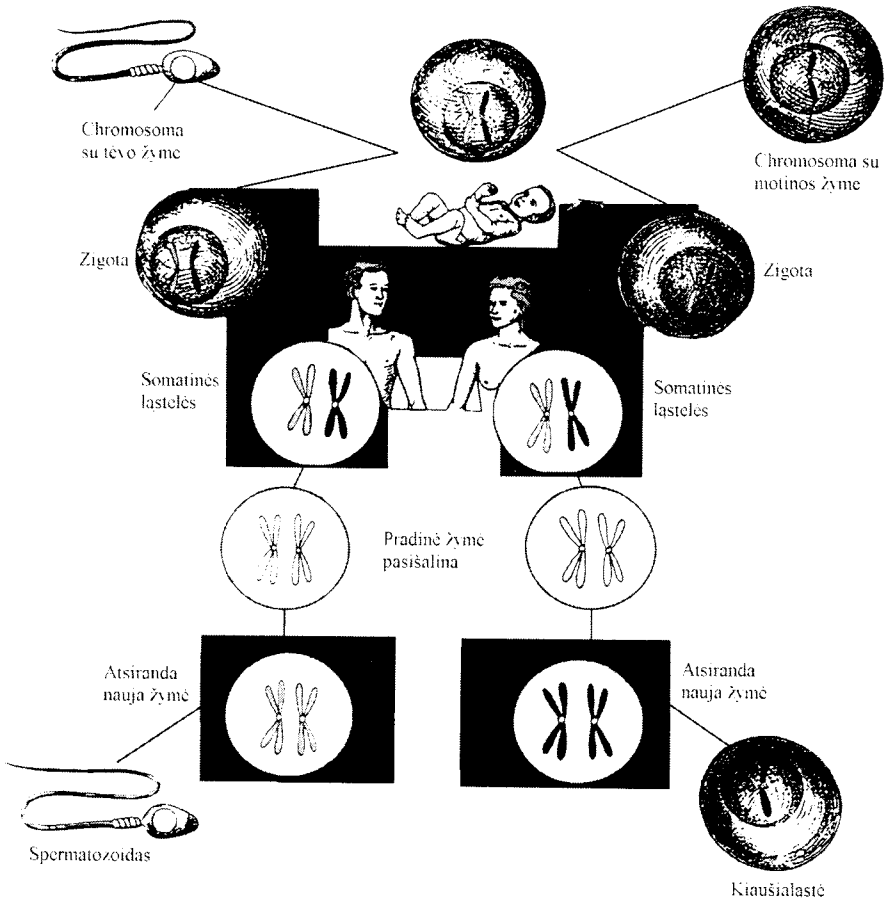
To paties geno struktūrinės atmainos – **aleliniai genai** dažniausiai modifikuojami vienodai. Tik kai šie genai skiriasi sekomis, svarbiomis imprintingui, jų žymėjimo pobūdis gali skirtis. Kai dėl mutacijos genas praranda žymėjimo vietą, pasekmės yra tos pačios, lyg būtų šio geno delecija atitinkamame (tėvo ar motinos) genome arba geno ekspresija yra bialelinė.

Kaip pasirinktinai metilinant DNR žymimi genai, parodysime pavyzdžiu (tai ne įsiminti, o suvokti). Mūsų klasikinis pavyzdys – Angelmano ir Praderio-Vilio sindromai. Kaip jau buvo sakyta, 15q11–13 segmente yra genų duetas. *SNRPN* geno aktyvus tėvo alelis, o *D15S10* geno – motinos alelis. Per 96% visų 5′-CG-3′ (iš viso jų 23) dinukleotidų aplink *SNRPN* 1-ąjį egzoną yra metilinti motinos chromosomoje ir visiškai nemetilinti tėvo chromosomoje. Priešingas yra *D15S10* geno metilinimas. Sustiprėjęs tėvo alelio ir susilpnėjęs motinos alelio metilinimas.

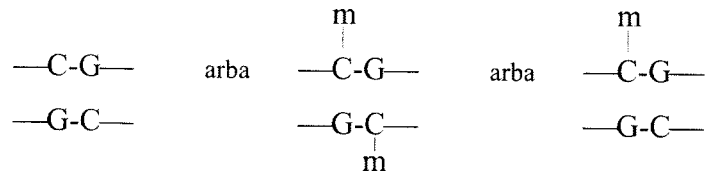
DNR metilinimas yra ne vienintelė epigenetinių pokyčių, tarp jų ir genomo imprintingo priežastis. Tai įrodyta mutacijų metodu. Tik kiti epigenetinio paveldimumo mechanizmai dar neištirti.

Metilinimas keičia chromatino sandarą, nukleosomų fazavimą – apsivyniojančių apie histoninę šerdį DNR sekų padėtį. Manoma, kad ir kiti veiksniai ir vyksmai, kurie keičia chromatino sandarą, gali būti epigenetinių pokyčių ir laikino paveldimumo priežastis. Antai kitą epigenetinį reiškinį – žinduolių X chromosomos virsmą Baro kūneliu lemia ne tik DNR metilinimas, bet ir histonų acetilinimo pokyčiai.

Genomo imprintingo valdymas. Nekyla abejonių, kad genomo imprintingas yra genetiškai valdomas. Pagal metilinimo pobūdį DNR skiriamos trys padėtys:



3.28 pav. **Genomo imprintingo ciklas:**
chromosomos, paveldėtos iš motinos ir tėvo, žymėtos skirtingai; susidarant generatyvinėms ląstelėms, dar prieš mejozę, žymė išnyksta; abi homologinės chromosomos žymimos naujai: vienaip tėvo, kitaip motinos. Ciklas kiekvienoje kartoje kartojasi



Nemetilinta vieta Visiškai metilinta vieta Pusiau metilinta vieta

Manoma, kad DNR metilazės pažįsta pusiau metilintas vietas, bet genomo imprintingui paaiškinti to nepakanka. Turi būti genai, kurie valdytų specifinį konkrečių nukleotidų sekų žymėjimą tam tikrose (lytinėse) ląstelėse. Antai *IGF2* geno žymėjimas reguliuojamas *IGF2R* geno. Nekelia abejonių, kad yra specifiniai baltymai, valdymo genų produktai, skiriantys nukleotidų sekas, kurios turi būti pažymimos ir kurios jau yra pažymėtos.

Du baltymai (MeCP – angl. *methil-CpG binding protein*), kurie pažįsta metilintą DNR ir slopina jos veiklą (paverčia monoaleline ekspresija), yra nustatyti. Bet tai tik pradžia, nes apskritai genomo imprintingo valdymas dar neišspręsta problema.

3.7.2. X chromosomos inaktyvinimas. Dozės kompensacija

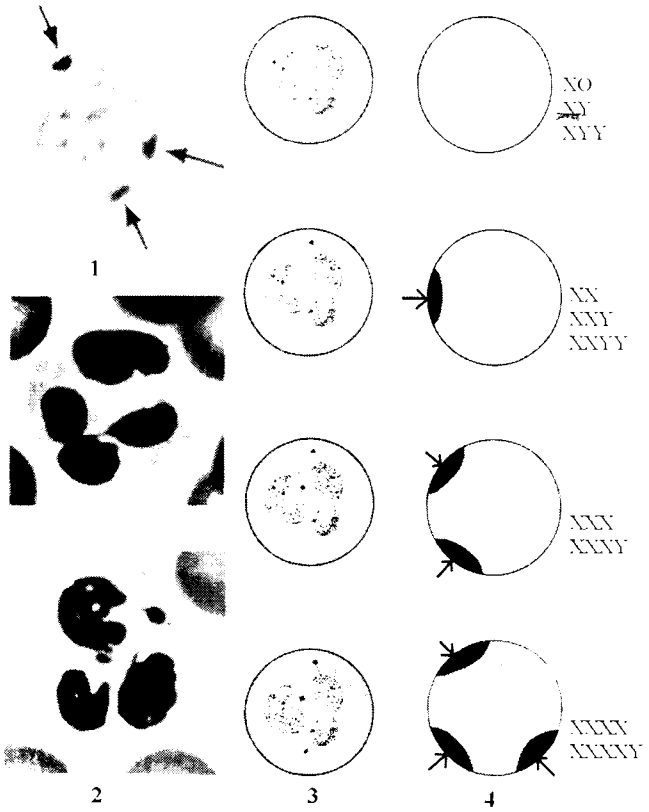
Lytis nulemiama įvairiais būdais (žr. p. 383). Daugelis organizmų turi savitas **lytines chromosomas**.

Dozės kompensacija (lot. *compensare* – sudaryti pusiausvyrą, atlyginti) yra problema visų tų organizmų, kurių vyriškoji lytis nuo moteriškosios lyties skiriasi chromosomų skaičiumi. Kol kas ši problema ištirta tik žinduolių ir drozofilos.

Drozofilos, kaip ir žmogaus, moteriškosios lyties individai turi dvi X chromosomas, vyriškosios tik vieną. Tačiau tais požymiais, kuriuos lemiantys genai yra X chromosomoje, **moteriškoji lytis niekuo nesiskiria nuo vyriškosios, nors moteriškosios lyties individų ląstelėse šie genai ir yra dvigubos dozės**. Jau senokai buvo manoma, kad yra genų, kurie sulygina genų dozes vyriškosios ir moteriškosios lyties individų ląstelėse. Be to, paaiškėjo, kad įvairiuose organizmuose dozės kompensacija pasireiškia skirtingais būdais.

Baro kūnelis – neaktyvi X chromosoma. 1959 metais Baras (M. L. Barr) kačių patelių somatinių ląstelių branduoliuose, prie jų apvalkalėlių vidinės dalies, aptiko kūnelius, kurie buvo pavadinti jo vardu, arba **lytiniu chromatinu**. Vėliau Baro kūneliai aptikti ir kitų žinduolių, tarp jų ir žmogaus, moteriškosios lyties individų somatinių ląstelių branduoliuose.

Somatinėse ląstelėse Baro kūnelis (3.29 pav.) matomas kaip tamsi dėmė (žmogaus – 0,7×1,2μ). Kartais jo vieta yra neįprasta – šalia branduolėlio. Tačiau neįprasčiausios formos lytinis chromatinas yra neutrofiluose – grūdėtuose leukocituose (mikrofaguose). Šių ląstelių ir branduolys yra neįprastos sandaros – iš 3–4 segmentų, sujungtų



3.29 pav. **Lytinis chromatinas – Baro kūneliai ir būgno lazdelės:** Baro kūneliai parodyti rodyklė: *1* – trys Baro kūneliai viename branduolyje (kariotipas – XXXX arba XXXXY); *2* – viršuje – normalaus vyro polimorfobranduolis leukocitas be „būgno lazdelės"; apačioje – normalios moters – su viena „būgno lazdele"; *3* ir *4* – Baro kūnelių ir „būgno lazdelių" skaičius priklausomai nuo X chromosomų skaičiaus

plonais siūlais, todėl jos dar vadinamos polimorfobranduoliais leukocitais. Šių ląstelių lytiniu chromatinu virtusi X chromosoma yra įvairios formos (būgno lazdelės, teniso raketės, kolbelės) branduolio priedas.

Ono (S. Ohno) ir Lajon (M. F. Lion) pasiūlė hipotezę, kad žinduolių X chromosomoje esančių genų dozė kompensuojama moteriškosios lyties individų somatinėse ląstelėse inaktyvinantis vienai iš dviejų X chromosomų. Vėlesni tyrimai šią hipotezę patvirtino. Tuo įsitikinta, kai buvo ištirti žmogaus ir kitų žinduolių X chromosomos aneuploidai (3.29 pav.).

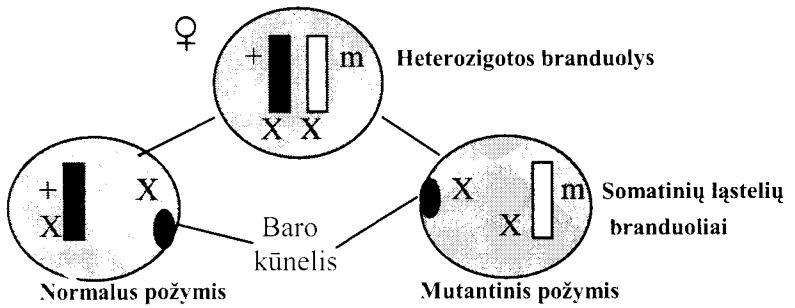
Antai esant Klainfelterio sindromui **XXY**, vienas Baro kūnelis būna ir daugumoje vyrų somatinių ląstelių, o moterų, turinčių tik **vieną X** chromosomą (Ternerio sindromas), – nė vieno. Vyrai su trimis X chromosomomis – **XXXY,** kaip ir moterys **XXX**, turi du Baro kūnelius. Kai branduolyje yra **keturios X chromosomos**, tiek vyrai, tiek moterys turi 3 Baro kūnelius.

Vadinasi, iš aneuploidų tyrimų paaiškėjo bendra X chromosomos inaktyvinimo taisyklė:

Baro kūnelių yra vienu mažiau negu X chromosomų.

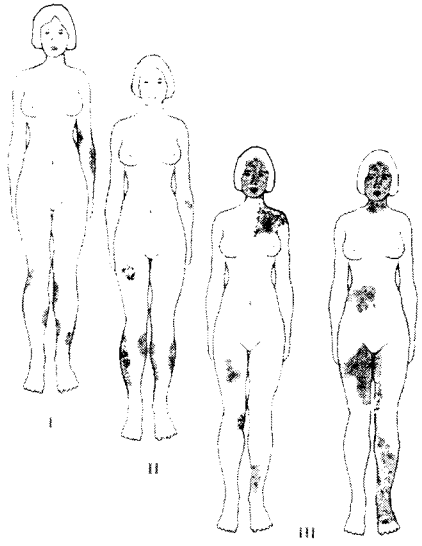
Tačiau ši taisyklė **negalioja poliploidams**, kurie turi kelis visų chromosomų rinkinius. **Triploido** (3n) somatinėse ląstelėse Baro kūnelių skaičius nenusistovėjęs – vienas arba du. **Tetraploido** (4n) yra du Baro kūneliai.

Kuri iš X chromosomų inaktyvinasi, yra atsitiktinis dalykas. Tuo įsitikinta tiriant moteris, heterozigotines pagal kai kuriuos „sukibusius" su lytimi genus, pavyzdžiui, pagal gliukozo-6-fosfatdehidrogenazės arba raumenų distrofijos, genus. Šių moterų vienoje chromosomoje yra normalus genas (+), kitoje – mutantinis genas. Jų somatinės ląstelės mozaikiškos. Vienos somatinės ląstelės yra normalios, kitos – su anomaliniu požymiu. Tai priklauso nuo to, kuri iš dviejų **X** chromosomų inaktyvinasi: ar ta, kurioje yra raumenų distrofijos genas (tada raumens ląstelė normali), ar ta, kurioje yra normalus genas (tada ląstelė yra distrofinio tipo):



Sterblinių žinduolių X chromosoma inaktyvinasi neatsitiktinai. Pirmenybė yra iš tėvo paveldėtai X chromosomai. Taigi šių gyvūnų X chromosomos virsmą Baro kūneliu nulemia genomo imprintingas.

X inaktyvacija – epigenetinis reiškinys. Nors dar labai neaišku, kaip tai vyksta, bet X chromosomos inaktyvacijos pobūdį paveldi didesnis ar mažesnis ląstelių klonas. Tuo įsitikinta ištyrus moteris,



3.30 pav. **Ektodermos displazija. Trys heterozigotinių moterų kartos, paskutinioji – identiškosios dvynės:** tamsiau nudažytos kūno paviršiaus dalys be prakaito liaukų (inaktyvinta X chromosoma su normaliu genu); paviršiaus „lopas" reiškia ląstelių kloną; likusi oda yra normali, su prakaito liaukomis (inaktyvinta X chromosoma su ektodermos displazijos genu)

heterozigotines pagal recesyviuosius „sukibusius" su lytimi genus. Labai patogus, nors ir retas požymis – ektodermos displazija. Tai irgi „sukibęs" su lytimi recesyvusis požymis. Sutrikusi ektodermos raida. Vyrai, kurių X chromosomoje yra šis genas, bedančiai, turi mažai plaukų ir neturi prakaito liaukų.

Pagal šią ypatybę tiriamos heterozigotinės moterys (3.30 pav.). Akivaizdu, kad ištisas odos lopas be prakaito liaukų – tai **ląstelių klonas**, kurio pradinėje ląstelėje inaktyvinosi X chromosoma su normaliu genu.

Ląstelių klonas kelia daugiausia neaiškumų. Mat dalijantis somatinėms ląstelėms, Baro kūneliu virtusi X chromosoma padvigubėja, kaip ir kitos chromosomos. Vadinasi, Baro kūnelis vėl turi virsti įprastos sandaros chromosoma. Pasibaigus mitozei, chromosoma turi inaktyvintis pagal motininėje ląstelėje nustatytą tvarką.

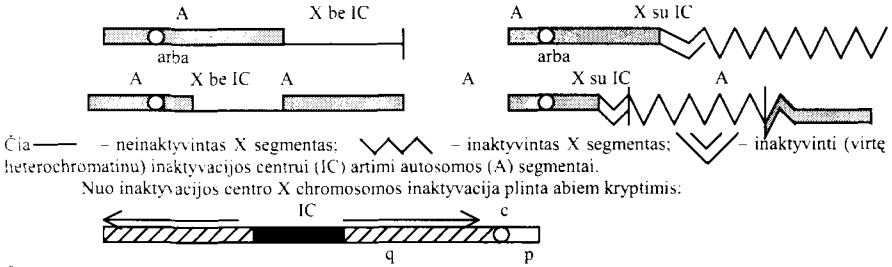
Tačiau kol kas bendra visų epigenetinių reiškinių problema yra ta, kad neaišku, kaip šie reiškiniai išlieka po kiekvieno naujo ląstelių dalijimosi.

DNR metilinimas dar neišsprendžia šios problemos, nors Baro kūnelyje DNR yra itin stipriai metilinta. Metilinimas paaiškina X chromosomos inaktyvaciją, bet to nepakanka paaiškinti, kaip formuojasi Baro kūnelis – ypatingas X chromosomos chromatino virsmas. Taigi vyksta ir kiti pokyčiai. Antai pirmiausia labai stipriai acetilinamas histonas H4.

Baro kūnelio ir kitus epigenetinius reiškinius lemia **stabilūs valdymo genų veiklos pokyčiai.**

***Xist* genas ir inaktyvacijos centras.** X chromosomos inaktyvacija prasideda inaktyvacijos centre. Šis centras aptiktas translokacijų metodu. **Translokacijos** – tai chromosomų mutacijų tipas, kai chromosomos segmentas perkeliamas iš vienos chromosomos vietos į kitą vietą toje pačioje chromosomoje arba apskritai į kitą chromosomą.

Paprastai, perkelti X chromosomos segmentai į autosomas nėra inaktyvinami. Tačiau pataikius į autosomas perkelti segmentą su inaktyvacijos centru, gali virsti heterochromatinu ne tik šis translokuotas X chromosomos segmentas, bet ir jam artimi autosomos segmentai:



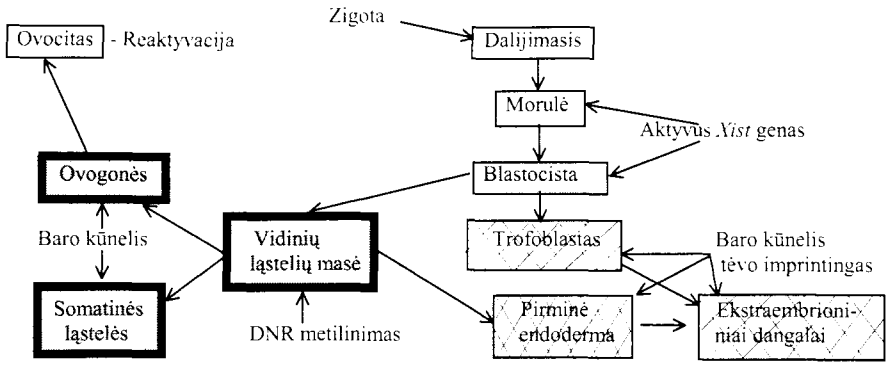
Čia IC – inaktyvacijos centras, c – centromera, q – ilgasis petys, p – trumpasis petys. Neužbrūkšniuotas trumpasis petys p, kuriame yra aktyvusis rajonas (Xp 22.13-22.3).

Ištyrus įvairias X chromosomos segmentų delecijas ir translokacijas, buvo nustatyta, kad inaktyvacijos centras yra Xq13 segmente. Šiame lokuse yra labai įdomus genas *Xist* (angl. *X-inactivating specific transcript*). *Xist* genas buvo klonuotas. Paaiškėjo, kad jis nekoduoja baltymo (neturi atviro skaitymo rėmelio). Aktyvus yra jo transkriptas – RNR. Jis tiesiog apgaubia tą X chromosomą, kuri yra inaktyvinama.

Išlieka aktyvūs ne tik genai, kurie yra neinaktyvintame trumpajame X chromosomos petyje p, bet ir kai kurie genai, esantys Baro kūneliu virtusiame chromatine. Manoma, kad jie yra išorinėje Baro kūnelio dalyje.

X chromosomos virsmo Baro kūneliu ciklas. Žmogaus X chromosomos inaktyvacija prasideda 5-ąją embriono vystymosi parą. Morulėje arba blastocistoje aktyvinamas *Xist* genas. Jis veikia abiejose X chromosomose, bet po to, kai Xist-RNR stabilizuojama ir apgaubia inaktyvinamą X chromosomą, *Xist* genas veikia tik šioje chromosomoje. Inaktyvinamoje X chromosomoje DNR metilinimas prasideda vėliau – tik 7-ąją parą. Pirmieji Baro kūneliai pasirodo trofoblastuose 12-ąją parą, o pačiame gemale – tik 16-ąją vystymosi parą.

Ovogonėse Baro kūnelis dar yra, o ovocituose jis jau išnykęs. Inaktyvinta X chromosoma vėl reaktyvinama:



Dozės kompensacija somatinėse drozofilos ląstelėse vyksta kitaip. Patinėlio X chromosomoje genai veikia dvigubai aktyviau negu patelės X chromosomoje. Taip yra dėl specialių valdymo genų-**numeratorių** veiklos. Tie genai moka suskaičiuoti, ar yra lyginis (patelė), ar nelyginis (patinėlis) X chromosomų skaičius.

Žmogaus X chromosomoje kol kas genų-numeratorių nerasta, tačiau turėtų būti, nes kaip kitaip paaiškinti taisyklę, kad yra vienu Baro kūneliu mažiau, negu yra X chromosomų. Vadinasi, skaičiuojamos ir žmogaus bei kitų žinduolių X chromosomos. Gali būti šios skaičiuotės sutrikimų, pvz., dėl duplikacijų.

Žinduolių X chromosoma inaktyvinasi etapais:

- ekspresuojamas (veikia) ***Xist*** genas;
- signalas plinta į abi puses nuo inaktyvacijos centro, inaktyvinama didesnė dalis X chromosomos;
- inaktyvinta X chromosoma virsta Baro kūneliu.

Laipsniška X chromosomos inaktyvacija paaiškina du svarbius reiškinius.

Pirma, kodėl dalijantis somatinėms ląstelėms dukterinėse ląstelėse išlieka X chromosomos inaktyvacijos pobūdis, tipiškas motininei ląstelei? Dalijantis somatinėms ląstelėms mitozėje, Baro kūneliu virtusi X chromosoma neprarandama, ją paveldi dukterinės somatinės ląstelės. Kad abi X chromosomos padvigubėtų ir jų kopijos būtų taisyklingai paskirstytos tarp dukterinių ląstelių, Baro kūneliai kuriam laikui turi virsti įprastos sandaros X chromosomomis. Kadangi X chromosomos inaktyvacija ir virsmas Baro kūneliu atskirti laiko tarpsnio, ląstelė dalydamasi vėl tampa įprastos sandaros chromosoma, bet išsaugojamas inaktyvacijos pobūdis. Šios chromosomos virsmas Baro kūneliu kiekviename ląstelių cikle kartojasi:

		Įprastos sandaros,		
Baro kūnelis	→	bet inaktyvinta X chromosoma	→	Baro kūnelis
Interfazė	→	Mitozė	→	Interfazė

Šie įvykiai kol kas nepakankamai ištirti.

Mutantinio „sukibusio“ su lytimi požymio pasireiškimo heterozigotinių moterų somatinėse ląstelėse pobūdis rodo, kad ląstelėms dalijantis X chromosomų inaktyvacija gali keistis (žr. 3.30 pav.). Vieną fenotipinį lopą keičia kitokio fenotipo somatinių ląstelių klonas.

Antras reiškinys, kurį paaiškina laipsniška X chromosomos inaktyvacija: **kodėl ne visos moters somatinės ląstelės turi Baro kūnelį?** Antai 30% fibroblastų (jų kultūrose) neturi Baro kūnelio. „Būgno lazdelės“ turi tik šiek tiek daugiau kaip 1% moters neutrofilų. Matyt, kad tose normalaus kariotipo moters ląstelėse, kuriose nėra Baro kūnelio, inaktyvinta X chromosoma nevirto Baro kūneliu.

3.7.3. Paramutacijos. Ilgalaikės modifikacijos

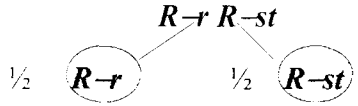
Paramutacijų atradimas. 1956 m. amerikiečių genetikas Brinkas (R. A. Brink) tyrė vieno kukurūzų antociano geno ***R*** įvairių alelių sąveiką. Kryžmino recesyviąją liniją ***r–g r–g*** su hibridu – heterozigota pagal dominuojančius genus ***R–r*** ir ***R-st***:

♀ ***r–g r–g*** × ♂ ***R–r R–st***

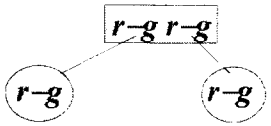
Tai tipiškas Mendelio sugalvotas analizuojantysis kryžminimas, kuriuo kokybiškai ir kiekybiškai tiriami lytinių ląstelių genotipai. Brinko tirtieji aleliai lėmė tokią endospermo spalvą:

r–g – nenudažytą, *R–r* – raudoną, *R–st* – margą.

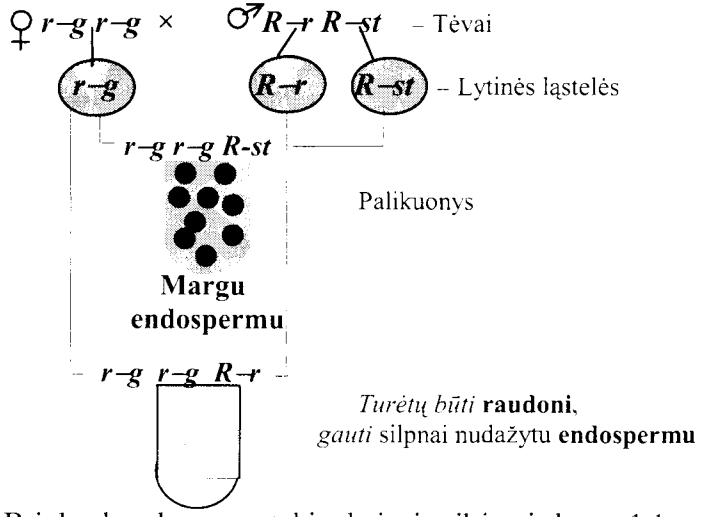
Diploidinio heterozigotinio organizmo, koks buvo *R–r R–st*, lytinės ląstelės turėtų būti dviejų tipų:



Tuo tarpu visos recesyviojo homozigotinio organizmo lytinės ląstelės vienodos:



Be to, per analizuojantį kryžminimą jos nelemia palikuonių savybių (fenotipo). Viskas priklauso nuo tiriamojo heterozigotinio organizmo: kokios ir kokiu santykiu susidaro jo lytinės ląstelės. Pvz., visas kryžminimas ir palikuonys turėtų būti tokie:



Brinko bandyme santykis, kaip ir tikėtasi, buvo 1:1: pusė laukiamų margų (endospermo genotipas dėl dvigubo augalų apsivaisinimo yra triploidinis *r–g r–g R–st*) ir pusė netikėtai silpnai nudažytų, kai turėtų būti *r–g r–g R–r* – sodri raudona spalva.

Brinkas heterozigotinius silpnai nudažytu endospermu augalus vėl patikrino atlikdamas analizuojančiuosius kryžminimus:

♀ *r–g r–g* × ♂ *R–r′ r–g*

Palikuonys buvo tokie:
pusė – nenudažytu endospermu – *r–g r–g r-g*:
pusė – silpnai nudažytu endospermu – *r–g r–g R–r′*.

Iš šio bandymo Brinkas padarė išvadą, kad *R–st* alelio paveiktas *R–r* alelis paveldimai pakinta. Šį pakitusį alelį jis pažymėjo *R–r′*. Pokytis paveldimas iki šiol (daugiau kaip 40 metų).

3.4 lentelė. **Paramutageniški, paramutabilūs ir neutralūs kukurūzų antociano spalvos *b* ir *pl* genų aleliai** (pagal V. L. Chandler et al., 1996)

Alelis	Fenotipas	Paramutacijų aktyvumas
B-Intense (B-I)[a]	Tamsiai purpuriniai augalai	Paramutabilus
B'[a]	Silpnai purpuriniai augalai	Paramutageniškas
b-w[a]	Žali augalai	Paramutabilus
B-Peru[b]	Silpna augalų spalva; stipri purpurinė sėklų spalva	Neutralus
Pl-Rhoades (Pl-Rh)[c]	Tamsiai purpuriniai augalai ir kuokeliai	Paramutabilus
Pl'-mahogany (Pl-mah)[c]	Raudonmedžio raudonumo augalų spalva; kuokeliai margi	Paramutageniškas
Pl-Bloched (Pl-Bh)[d]	Marga/dėmėta augalų ir kuokelių spalva	Neutralus

Paramutageniški, paramutabilūs ir neutralūs aleliai. Pokyčius Brinkas pavadino **paramutacijomis** (gr. *para* – šalia, prieš), alelius, kurie keičia kitus alelius – **paramutageniškaisiais**, o tuos alelius, kurie pasikeičia, – **paramutabiliaisiais**. Vadinasi, ***R–r′*** yra paramutacija, ***R–st*** – paramutageniškasis alelis, o ***R–r*** – paramutabilusis alelis.

> **Paramutacija** – tai mitozėje ir mejozėje paveldimas pokytis, kurį sukelia heterozigotose vienas alelis (paramutageniškasis) kitam (paramutabiliajam).

Pagal paramutacijas to paties geno aleliai skirstomi į **paramutageniškuosius, paramutabiliuosius ir neutraliuosius.** Pastarieji yra ir neparamutageniški, ir neparamutabilūs. 3.4 lentelėje pateikti 2-jų lokusų *b* ir *pl* visų trijų alelių tipų pavyzdžiai.

Įdomu, kad paramutacija pasireiškia tik tada, kai ***r–g r–g*** yra motina, o ***R–st R–r*** – tėvas, nors paramutacija įvyksta ir tada, kai heterozigota yra motina, tik paramutacija nepasireiškia fenotipe.

Paramutacija – epigenetinis reiškinys. Iki šiol nustatyti 3 kukurūzų genai, kurių aleliai yra pramutageniški ir paramutabilūs. Tai minėtasis *r* (*red*), *pl* (*pale*) ir *b* (*booster*). Visi trys genai valdo antociano sintezę. Tai valdymo genai. Jie koduoja HLH (angl. *helix–loop–helix* – spiralė–kilpa–spiralė) tipo transkripcijos veiksnius (žr. p. 318).

Dvi paramutacijų savybės yra išskirtinės. Pirmiausia jos atsiranda tik heterozigotose neišpasakytai aukštu dažniu, nebūdingu kitiems kintamumo reiškiniams. Paramutageniškai aktyviose heterozigotose (pvz., *R–st R–r*) visos lytinės ląstelės gali būti pakitusios. Tiesa, ne visi

paramutageniški aleliai vienodai stiprūs. Pvz., *R–mb* alelis nors ir paramutageniškas, bet jo poveikis gerokai silpnesnis negu *R–st* alelio.

Antroji savybė geriausiai įrodo, kad paramutacijos – epigenetinis reiškinys. Nors paramutageniškai aktyvūs kukurūzų *r, b, pl* genai yra klonuoti ir sekvenuoti, bet **nukleotidų sekų pokyčio paramutabiliuose aleliuose neaptikta**. Neaptikta ir DNR metilinimo skirtumų. Nors paramutacijų prigimtis kol kas neaiški, bet manoma, kad tai paveldimi, stabilūs genų transkripcijos pokyčiai. Delecijų metodu nustatytos nukleotidų sekos, dėl kurių prarandamas alelio paramutageniškumas arba paramutabilumas.

Ilgalaikės modifikacijos nesusijusios su heterozigotiškumu, tačiau čia yra galimybė aptikti naujus epigenetinio paveldimumo reiškinius.

Aplinkos poveikio sukeltos **modifikacijos** yra nepaveldimi organizmo organų, požymių bei savybių pokyčiai.

Jos paprastai yra trumpalaikės, pasireiškia tik toje kartoje, kurioje veikia modifikaciją sukeliantis veiksnys. Kitose kartose ją sukeliančiam veiksniui nepasireiškus, modifikacijos išnyksta. Tačiau aptikta ir ilgalaikių modifikacijų, kurios persiduoda kitai, o kartais ir keletui kartų, nors ir neveikia modifikaciją sukėlęs aplinkos veiksnys.

Ilgalaikių modifikacijų priežasčių yra daug. Kai kurios jų yra labai paprastos. Antai labai geromis sąlygomis augantys augalai ne tik duos gerą derlių, bet ir kitais metais bus derlingesni už tuos, kurie išaugo iš blogomis sąlygomis augintų augalų. Mat iš geromis sąlygomis auginamų augalų sėklos stambesnės, sukaupusios daugiau maisto medžiagų. Iš jų išauga stipresni daigai. Lygiai taip pat ir gyvuliai. Silpnesnių, blogomis sąlygomis gyvavusių tėvų palikuonys būna silpnesni. Veislininkystėje tai svarbi aplinkybė.

Gana dažnai žmonės savo ūkinėje veikloje susiduria su **tariamu požymių paveldėjimu** dėl to, kad modifikaciją sukeliantys veiksniai tam tikroje ekologinėje aplinkoje per daugelį kartų yra pastovūs. Pirmasis su tokiu reiškiniu susidūrė Bonė (G. Bonnier), bandydamas auginti kai kurias tariamai alpines augalų rūšis žemumose. Jis nustatė, kad šios rūšys yra modifikacija. Tos pačios rūšies augalai kalnuose išauga trumpu stiebu, dažnai sudarydami tik lapų skrotelę (panašiai kaip gyslotis), o žemumose augalų stiebas aukštas (3.31 pav.). Mat nuolat aukštumose augantys augalai turi vienokį fenotipą, žemumose – kitokį.

3.31 pav. **Paprastasis saulenis** (*Helianthemum nummularium*) žemumose (*a*) ir kalnuose (*b*)

Panašiai yra ir su kultūriniais augalais. Neprižiūrėti jie negali konkuruoti su laukiniais augalais ir išauga menki. Tačiau visai kitokia jų genotipo sukeliama reakcija į palankias sąlygas. Laukiniai augalai šia genotipo savybe nepasižymi, todėl ir labai palankiomis sąlygomis neduos tokio derliaus priedo, kaip žemės ūkio augalai.

Tačiau yra ilgalaikių modifikacijų, kurias lemia mejozės būdu kurį laiką paveldimi epigenetiniai pokyčiai. Deja, šie pokyčiai kol kas netiriami. Epigenetinės kilmės ilgalaikių modifikacijų, kaip ir paramutacijų, dažnis gali siekti 100%.

Antai P. Svetlovas ir G. Korsakova nuo 1966 m. iš viso 10 metų tyrė dvi drozofilos mutacijas *f* (*forked* – išsišakoję šereliai) ir *ey* (*eyeless* – redukuotos akys, beakės). Abiejų genų pasireiškimą galima įvertinti kokybiškai. Tam tikrais jautriais drozofilos raidos periodais paveikus ją aukšta 38°C temperatūra (šiluminio šoko indukcijos sąlyga), atsirado ilgalaikės modifikacijos, trukusios per keletą dešimčių kartų ir buvo paveldimos tik iš motinos. Gali būti, kad šie pokyčiai ekstrachromosominės prigimties, nors tai dar netirta.

N. Christoliubova drozofilas paveikė etilendinitrilotetraacetatu (EDTA). Ši medžiaga suriša dvivalenčių ir trivalenčių metalų jonus. Susidarė papildomų branduolėlių. Kitose kartose modifikacija pamažu blėso, mažėjo individų, kurių ląstelėse buvo atsiradę papildomi branduolėliai. Šių skaičius ląstelėse irgi mažėjo, tačiau visiškai išnyko tik 22-ojoje kartoje. Čia visiškai aišku, kad pokytis susijęs su chromosomomis.

3.8. Genomo pertvarka

3.8.1. Viso genomo pertvarka ir jo pertvarka pirmuonių vegetatyvinių ląstelių branduoliuose

Net tokį gerai žinomą reiškinį kaip diplofazės kaita į haplofazę, ir atvirkščiai, per gyvenimo ciklą reikėtų priskirti šiai reiškinių

grupei. Juo labiau kad kai kurių organizmų haploidinis chromosomų skaičius tampa diploidiniu ne apsivaisininimo metu, o prasidėjus individualiai raidai, somatinėse ląstelėse. Taip yra, pvz., bičių tranų. Iš pradžių jie vystosi iš neapvaisintų kiaušinėlių, yra haploidiniai. Tokios išlieka jų generatyvinės ląstelės, bet somatinėse ląstelėse atkuriamas diploidinis chromosomų skaičius.

Tirtini I skyriuje minėti askaridžių (*Ascaris megalocephala*), kai kurių vabzdžių reglamentuoti chromosomų skaičiaus pokyčiai pereinant generatyvinėms ląstelėms į somatines. Antai askaridės generatyvinės ląstelės turi tik dvi chromosomas, somatinėse ląstelėse susidaro daug smulkių chromosomų. Dalis genetinės medžiagos yra prarandama (žr. 1.3 pav.). Ši askaridės genomo pertvarka prasideda 4 ląstelių stadijoje, ir 16 ląstelių stadijoje jau tik viena ląstelė turi pradinį 2 chromosomų genomą. Ši ląstelė tampa generatyvine ląstele, ir dukterinės jos ląstelės išsaugo pradinį genomą. Dar XIX šimtmečio pabaigoje Boveri (Th. Boveri) nustatė, kad šiuos pokyčius valdo ląstelės citoplazma. Išlieka nepakitęs tik tas branduolys, kuris besidalijančioje ląstelėje patenka į tam tikrą citoplazmos vietą. Askaridžių tyrimai, deja, toliau į priekį nėra pažengę, bet visiškai panašiai būsimos generatyvinės ląstelės yra determinuojamos drozofilos ovocito polinėje plazmoje (žr. p. 359). Citoplazmoje yra vadinamieji **morfogenai**, kuriuos atrasti labai padėjo Boveri tyrimai.

Nereikia manyti, kad askaridžių ar kai kurių musių genomo pokyčiai somatinėse ląstelėse yra itin didelė ir reta išimtis. Tiesiog dar daugelio primityvesnių, bet stambių taksonų genomai nepakankamai ištirti. Antai kai kurių samanų tame pačiame augale yra haploidinė-diploidinė ar net tetraploidinė (4n) dalis. Šiuo metu **smulkiai tiriami genomai tų eukariotų, kurių gyvenimo cikle vyrauja diplontas**, tačiau ir jų somatinių ląstelių genomas gali iš esmės skirtis nuo zigotos ir gemalinių ląstelių genomo.

Visam blakstienotųjų (*Ciliophora*) tipui būdinga sudėtinga viso genomo pertvarka susidarant makrobranduoliui iš mikrobranduolio vegetatyvinėse ląstelėse.

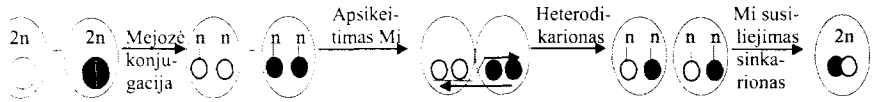
Genomo pertvarka infuzorijų (*Ciliata*) makrobranduoliuose. Iš šios infuzorijų klasės geriau ištirtos tik kai kurios dviejų būrių – *Hymenostomata* (*Tetrahymena* ir *Paramecium*) ir *Hypotricha* (*Oxytricha*, *Stylonychia*, *Euplotes*) gentys. (Sistematika pateikiama pagal R. Kazlausko knygą „Bestuburių zoologija", 1988, nes pirmuonių stambiųjų taksonų sistematika ir lotyniški pavadinimai literatūroje gerokai skiriasi).

Infuzorijų ypatybė – **dvejopi branduoliai.** Jos turi vieną ar daugiau diploidinių **mikrobranduolių** ir vieną arba daugiau poligenominių makrobranduolių. **Makrobranduolys** – vegetatyvinės ląstelės požymis. Jo nėra generatyvinėse ląstelėse.

Rekordinis mikro- ir makrobranduolių skaičius aptiktas pilvablakstienėje infuzorijoje *Urostylis grandis* – daugiau kaip 100.

Mikrobranduolys (Mi) yra smulkus, bet turi stambias chromosomas. Jis dalijasi mitoziškai, o prieš infuzorijų konjugaciją ar jos metu – ir mejoziškai (po mejozės Mi yra 1n). Turi visą genų rinkinį. Jo chromosomos kondensuotos, todėl RNR sintezė beveik nevyksta, išskyrus kai kuriuos morfogenezei svarbius (pvz., burnos) genus.

Vykstant konjugacijai, ląstelės apsikeičia haploidiniais mikrobranduoliais:



Makrobranduolys (Ma) yra stambus, dalijasi amitozės būdu. Išsivysto iš mikrobranduolio, kai šis dalijasi nesidalijant ląstelei. Kiek kartų dalysis mikrobranduolys, priklauso nuo genties. Vienas ar keli mikrobranduoliai išlieka. Juose išsaugoma visa genetinė informacija. Kitas arba kiti mikrobranduoliai virsta makrobranduoliu arba makrobranduoliais.

Skiriami du pagrindiniai Mi virsmo Ma tipai. Vienam jų atstovauja klumpelinės infuzorijos (*Hymenostomata*), kitam – pilvablakstienės infuzorijos (*Hypotricha*).

Tetrahymena makrobranduoliuose prarandama tik apie 10–20% genomo. Apie 100 susidariusių vadinamųjų **subchromosomų** yra ilgos, vidutiniškai 600 kb.

Hypotricha būrio pirmuonių makrobranduolyje prarandama didžioji genomo dalis. *Oxytricha* išlieka apie 10% viso Mi genomo. Susidaro daugybė – iki 20000 smulkių chromosomų. Jos vadinamos **minichromosomomis**. Vidutinis jų ilgis apie 2,2 kb. Taigi minichromosoma, galima sakyti, yra vienas genas. Tuo tarpu Mi chromosomų vidutinis ilgis net 9000 kb. *Stylonychia* Ma išlieka tik 1,6% Mi genomo. Nors didelė dalis genomo pašalinama, bet makrobranduolyje DNR yra 40–50 kartų daugiau, negu Mi.

Ma didžiąją genomo dalį sudaro genai, koduojantys baltymų sintezei reikalingus baltymus ir RNR, daugiausia rRNR.

Makrobranduolių susidarymas vyksta dviem etapais įvairiais variantais, būdingais konkretiems taksonams. Pirmuoju etapu pašalinama dalis chromosomų arba jų dalių. Vyksta diminucija. Tada likusioji genomo dalis amplifikuojama, ir susidaro politeninės chromosomos (3.32 pav., *A*). Jų sandara labai panaši į drozofilos seilių liaukų politeninių chromosomų sandarą.

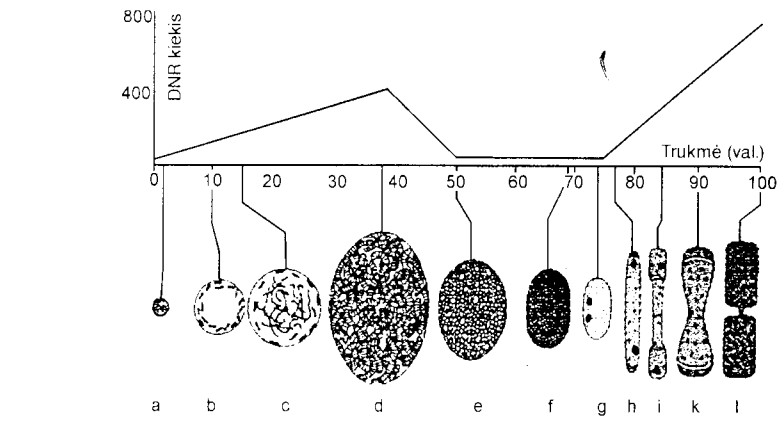
Hypotricha (*Stylonychia, Euplotes* ir kt.) po to vyksta antrasis etapas. Politeninės chromosomos sukarpomos į trumpus segmentus, kuriuos skiria membranos. Kerpama tarp politeninių chromosomų diskų. Tada kiekvieną juostą iš visų pusių apsupa membrana. Juostos atsiduria pūslelėje (3.32 pav., *B*). Toliau vėl vyksta genomo diminucija. Pašalinami netranskribuojami tarpikliai, vidinės juostelių dalys. Prijungiamos telomeros.

Pūslelių susidarymas primena pūsleles pertvarkomajame *Ascaris megalocephala* somatinių ląstelių branduolyje (3.32 pav., *C*).

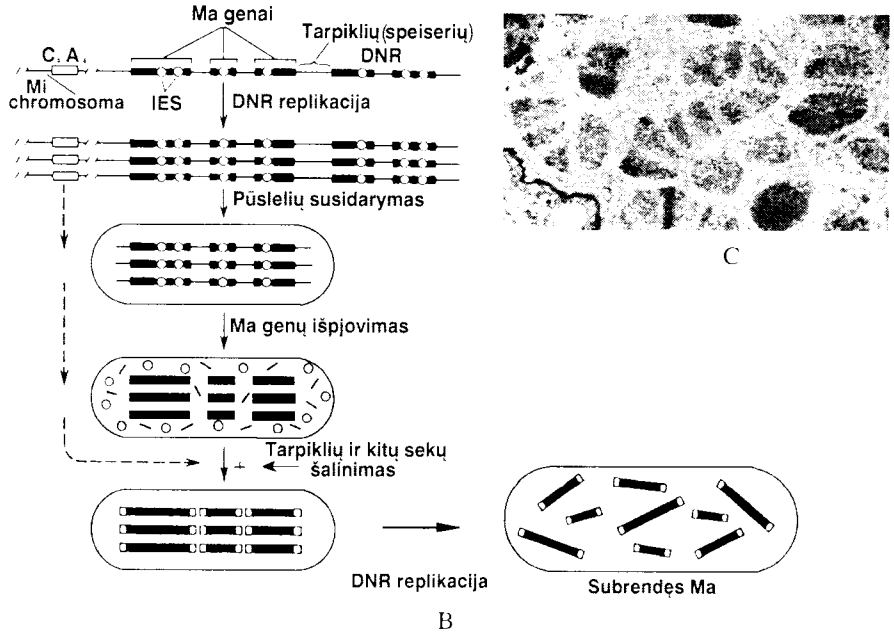
Kiti pirmuonys. Iš pirmuonių blakstienotieji evoliucijos pakopose užima aukščiausią padėtį. Sudėtingumo atžvilgiu tai viršūnė, kurią pasiekė vienaląsčiai gyviai. Todėl mikro- ir makrobranduolius irgi galima vertinti kaip šių gyvūnų genomo diferenciacijos viršūnę. Nors kitų pirmuonių tokios branduolio diferenciacijos nėra, bet genomo pertvarka irgi, matyt, vyksta. Gyvūniniams žiuželiniams atstovaujančių *Trypanosoma brucei*, kaip ir daugelio kitų pirmuonių, chromosomos nesikondensuoja ląstelei dalijantis. Dėl šios priežasties jas neįmanoma tirti šviesiniu mikroskopu. Tačiau chromosomos buvo nustatytos gel-elektroforezės pulsuojančiajame lauke metodu. Šiuo metodu galima frakcionuoti stambias DNR molekules (visą chromosomą). Keletas *T. brucei* chromosomų buvo tokios stambios, kad neįėjo į gelį. Trys buvo apie 2000 kb, šešios – 200–700 kb ir apie 100 minichromosomų 30–150 kb. Kitos rūšies *T. cruzi* minichromosomos mažesnės: 24–50 kb, bet stambesnės už infuzorijų minichromosomas.

Trypanosoma brucei minichromosomų kilmė nenustatyta, bet šio parazito genome aptiktas kitas, jau minėtas genomo pertvarkos būdas – ***vsg* genų translokacija iš vidinės chromosomų dalies į telomerą**. Tačiau minichromosomų DNR analizė rodo, kad tai ypatingos chromosomos. Jose labai daug palydovinės DNR (177–195 bp ilgio kartotinių sekų).

Sudėtingi branduolio pokyčiai vyksta miksosporidijų (*Myxosporidia*) ląstelėse, bet jie, matyt, paprastesni, susiję su poliploidija. Spėjama, kad poliploidija būdinga ir ameboms. Antai *Amoeba proteus* turi per 500 chromosomų.



A



B

C

3.32 pav. ***Hypotricha*** **makrobranduolio (Ma) susidarymas iš mikrobranduolio (Mi):** *A* – *Stylonychia lemnae*: *a, b, c, d* – nuo kondensuotų iki politeninių chromosomų; *e, f* – chromosomų fragmentacija ir pūslelių susidarymas; *g, h, i, k* – antrasis DNR replikacijos raundas ir jo fazės; *l* – subrendęs Ma; *B* – Genomo pertvarkos eiga. IES (vidinės kartotinės sekos) ir tarpgeninių tarpiklių DNR yra pašalinamos; C_4A_4 – kartotinės sekos, prijungiamos prie kiekvienos minichromosomos; **C** – *Stylonychia* makrobranduolio susidarymo tarpinis momentas – kiekvienas sukarpytas politeninės chromosomos diskas yra izoliuotas pūslelėje

Poliploidija ir politenija – du **genomo pertvarkos tipai,** būdingi aukštesniesiems eukariotams.

Poliploidija dažna augalų somatinėse ląstelėse. Kaip minėta, pasinaudodamas šiuo reiškiniu, vokiečių mokslininkas Vinkleris (H. Winkler) dar 1919 m. gavo pirmuosius dirbtinius poliploidus. Iš adventyvinių pumpurų išaugę pomidorų ūgliai buvo poliploidiniai.

Gyvūnų somatinės ląstelės yra dažniausiai diploidinės, bet ne visų organų ir audinių. Kepenų ląstelės, ypač neuronai yra poliploidiniai.

Politenija – jau nagrinėtas reiškinys (žr. p. 158). Politeninių chromosomų aptinkama dvisparnių (*Diptera*) somatinėse ląstelėse. Antai jų yra vaisinės muselės (*Drosophila*), uodo trūklio (*Chironomus*) lervų seilių liaukų ląstelėse. Kaip ne kartą minėta, politeninės chromosomos susidaro daug kartų kopijuojantis DNR, bet dukterinėms DNR kopijoms neišsiskiriant. Pvz., kiekviena drozofilos homologinė politeninė chromosoma turi 1024 DNR kopijas. Per abi konjugavusias homologines chromosomas bendras DNR kopijų skaičius – 2048.

Dėl poliploidijos ir politenijos padidėja visų genų skaičius ląstelėje, todėl šie reiškiniai vyksta tose somatinėse ląstelėse, kurios labai aktyvios arba jų veikla susijusi su genetinės medžiagos rizika – mutageniniais veiksniais.

Pvz., padidėjusios rizikos sąlygomis veikia kepenų ląstelės. Jos skaido įvairius ksenobiotikus. Ir ksenobiotikai, ypač jų skilimo produktai gali būti mutageniški. Vadinasi ne tik ląstelės aktyvumas, bet ir aplinkybės, kuriomis ląstelė veikia, lemia poliploidiją ir politeniją.

3.8.2. Pavienių genų skaičiaus pokyčiai – amplifikacija. Prisitaikymas prie toksinų ir kitokių veiksnių

Prieš daugelį metų šios knygos autorius klausėsi labai vaizdžios, impulsyvios T. Ivanausko paskaitos apie tai, kaip gaminami priešnuodžiai gyvatės nuodams. Karvei suleidžiama nemirtina nuodų dozė. Po to ji didinama, vėl ir vėl... Kol galų gale keliasdešimt kartų viršija mirtiną dozę, o karvei – nieko. Ji gyva. Ji prisitaikė prie nuodų. Tuo metu buvo žinomas tik reiškinys, bet labai nedaug žinoma apie jo priežastis.

Adaptacija – viena iš bendrųjų organizmo savybių. Prisitaikoma prie įvairiausių aplinkos ir vidinių veiksnių. Prisitaiko visi gyvi padarai, tarp jų ir žmogus prie narkotikų, vaistų ir kt. Prisitaikymo būdai įvairūs. Adaptacija skirstoma į **fiziologinę** ir **genotipinę.**

Genotipinė adaptacija yra **paveldimas prisitaikymas prie konkrečių veiksnių**. Jis vyksta veikiant atrankai. Genotipų atranka be paliovos vyksta. Jos negali nutraukti jokia sąmoninga ar nesąmoninga veikla. Genotipinė adaptacija garantuoja taksonui ilgalaikį, pastovų prisitaikymą.

Fiziologinė adaptacija – daugiau ar mažiau **staigus atsakas į kintančią aplinką.** Šio tipo adaptacija dažniausiai vyksta vienoje organizmo kartoje. Palikuonys jos nepaveldi. Bet ir ji priklauso nuo genų:

- arba kinta genų veikla (genų valdymo klausimas);
- arba vyksta somatinių ląstelių genomo pertvarka ir epigenetiniai pokyčiai.

Prisitaikymo prie nuodų būdai. Šis prisitaikymas tiriamas žinduolių ląstelių kultūrose. Per palyginti trumpą laiką ištirtos atsparumo priežastys daugeliui įvairių nuodingų ir nenuodingų aplinkos veiksnių, net fizinių, tarp jų jonizuojantiems ir ultravioletiniams spinduliams, aukštai ir žemai temperatūrai ir kt.

Prisitaikoma įvairiai. Vienas iš dažnesnių būdų – didesnės ar mažesnės genų grupės – **regulono aktyvacija, sukelianti atsaką į konkretų veiksnį** (ar veiksnių grupę).

Atsakai yra į įvairius veiksnius, ne tik į toksinus:

- šiluminio šoko atsakas;
- aminorūgščių ir apskritai bado atsakas;
- SOS atsakas (į DNR pažaidas, ypač DNR trūkius);
- Ada atsakas (į alkilinančiąsias medžiagas ir jų padarytas DNR pažaidas);
- sunkiųjų metalų atsakas;
- oksidacinio streso (OxyR, H_2O_2 ir SoX atsakai į laisvuosius radikalus ir peroksidus) ir kt. atsakai.

Atskiras reiškinys yra didėjantis atsparumas stiprėjant nepalankaus veiksnio poveikiui (dozei).

14. 1313

Laipsniškai atsparumą didina

- arba didesnį atsparumą lemiančių genotipų (genų) laipsniška atranka;
- arba vieno lokuso (pavienių genų – genų sankaupų) laipsniška amplifikacija.

Geriausiai ištirta amplifikacija lokusų, sąlygojančių atsparumą:

- folio rūgšties analogams – inhibitoriams metatreksatui (ametopterinui), aminopterinui (jie yra ir kai kurių paparčių nuodai); atsparumą sąlygoja dihidrofolatreduktazės (*dhfr*) genas;
- sunkiesiems metalams (kadmiui, cinkui, variui ir kt.); atsparumą sąlygoja baltymų metalotioneinų genai;
- nuodams, sąveikaujantiems su mikrovamzdelių baltymais tubulinais ir sukeliantiems poliploidiją (kolchicinui, vinkristinui ir kt.); atsparumą sąlygoja nedidelės molekulinės masės baltymų p19 ir p22 genai;
- N-fosfonacetil-L-aspartatui ir kitiems pirimidinų sintezės pirminių etapų inhibitoriams; atsparumą sąlygoja genų sankaupa, koduojanti iš karto tris fermentus: karbamoilfosfatsintazę, aspartatkarbamoiltransferazę, dihidroorotazę ir kt.

Visų šių genų amplifikacija didėja proporcingai didėjančiam atsparumui minėtiems nuodams.

Prisitaikymą prie nuodų lemiančių genų amplifikacija nėra vien žinduolių monopolis. Antai vabzdžių, atsparių fosfoorganiniams insekticidams, esterazės B genas amplifikuojamas iki 32 kartų.

Kryžmiškas atsparumas nuodams. Tirti atsparumą nuodams ypač skatino žmogaus ir kitų žinduolių somatinių ląstelių prisitaikymas prie **priešvėžinių vaistų**. Dažniausiai tai labai nuodingos, mutageniškos alkilinančios medžiagos. Prisitaikiusių prie alkilinančių medžiagų ląstelių tyrimai buvo labai sėkmingi. Aptiktas **Ada atsakas**, apie dešimt iki tol nežinomų DNR reparacijos genų (žr. p. 510), kurių veikla prisitaikiusiose prie alkilinančių medžiagų ląstelėse padidėja iki 200 kartų.

Prisitaikiusias prie priešvėžinio vaisto vėžines ląsteles bandyta „pergudrauti“: naudoti kelių skirtingos cheminės kilmės citotoksinių junginių deriniai arba gydymas cheminiais junginiais derintas su jonizuojančia spinduliuote. Bet čia laukė staigmena. Ląstelės, prisitaikiusios prie vieno nuodo, buvo atsparios kitiems nuodams. Taip buvo atrastas vadinamasis **kryžmiškasis atsparumas**. Jis irgi nėra vien žinduolių ląstelių monopolis. Antai vairenis ir pupos, atsparesnės EDTA

(etilendinitrilotetraacto rūgščiai – metalų jonus surišančiai medžiagai), buvo atsparūs ir alkilinančiosioms medžiagoms.

Kryžmiškąjį atsparumą irgi gali lemti vieno geno amplifikacija. Būtent transmembraninio baltymo – glikoproteino P. Kryžmiškai atsparios ląstelėse šis transmembraninis baltymas yra lyg ir pompa – baltyminė struktūra, kuria toksinai pašalinami iš ląstelės. Nuodai šalinami nespecifiškai, todėl ląstelės, kuriose įvyko glikoproteino P geno amplifikacija ir susidarė pompa, yra atsparios įvairiems nuodams. Vadinasi, atsparumas nuodams gali priklausyti ne tik nuo genų, kurie lemia inaktyvinančių nuodus fermentų sintezę, bet ir nuo genų, kurie lemia membranos nepralaidumą nuodams ir/arba aktyvų toksinų šalinimą iš ląstelės.

Bakterijų atsparumas toksinams. Membranų nepralaidumo reikšmė nustatyta seniai. Jis aptiktas tiriant bakterijas, atsparias antibiotikams. Tai viena iš svarbiausių medicininės bakteriologijos problemų. Konkretus antibiotikas būna veiksmingas tik kurį laiką. Vėliau bakterijos jau pasidaro jam atsparios. Nors bakterijų atsparumas antibiotikams ir kitiems toksinams (sunkiesiems metalams ir kt.) yra genotipinė adaptacija, bet paralelizmas žinduolių somatinių ląstelių prisitaikymui prie nuodų yra labai ryškus. Paaiškėjo, kad bakterijų atsparumas nuodams (o tokie yra ir antibiotikai) priklauso nuo:

- specialių fermentų, skaidančių ar surišančių nuodą,
- arba nuo ląstelių nepralaidumo.

Tai, pvz., nustatyta tiriant mikroorganizmų prisitaikymą prie penicilino. Gali būti aktyvi penicilinazė, bet gali būti ir nepraleidžiančios peniciliną ląstelės.

Atsparios antibiotikams ir kitiems nuodams bakterijos turi vadinamąsias **R plazmides**. Jos turi genus, lemiančius atsparumą įvairiems nepalankiems veiksniams: jonizuojantiems spinduliams, įvairioms cheminėms medžiagoms.

Antai plazmidė R100 turi šiuos atsparumo genus:
- *tet* – tetraciklinui,
- *str* – streptomicinui,
- *cml* – chloramfenikoliui,
- *sul* – sulfonamidui,
- *mer* – gyvsidabrio jonams,
- *fus* – fuzido rūgščiai.

Vadinasi, bakterijos, kurios turi R100 plazmidę, yra atsparios visoms suminėtoms medžiagoms.

Itin atsparių bakterijų plazmidės yra **daugiakopijinės**. Ląstelėse jų yra 10–20, taigi tiek pat kartų padidėjęs ir ląstelių atsparumas. Bet svarbiausia, kad atsparių nuodams bakterijų genome gali padidėti atsparumą lemiančių genų skaičius, t. y. gali vykti tikra amplifikacija.

Tai įrodo, kad amplifikacija yra universalus, įvairioms organizmų grupėms būdingas reiškinys, kurio užuomazgų reikia ieškoti prokariotų genome.

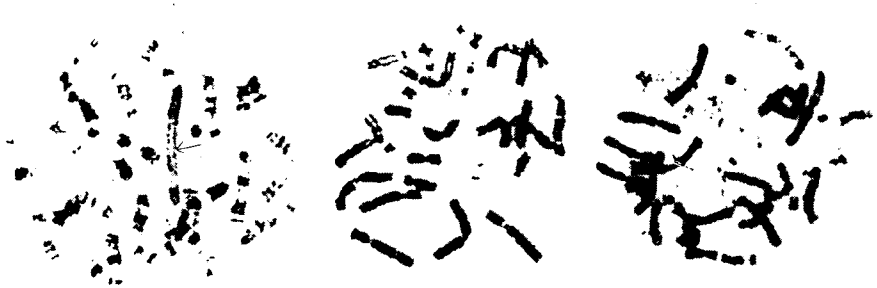
Amplifikuojami ne tik genai, kurie lemia atsparumą nuodams. Labai aktyviose ląstelėse (žmogaus, amfibijų, vabzdžių ovocitų, kai kurių gyvūnų regeneruojančių audinių, augančios acetabuliarijos, besivystančio viščiuko stuburo, infuzorijos makrobranduolių, dulkiadaigio ir kt.) vyksta rDNR geno-sankaupos amplifikacija. Kopijų skaičius yra proporcingas ląstelės aktyvumui. Jis gali padidėti iki 20000 kartų.

Drozofilos genome aptiktas dar vienas rRNR genų daugėjimo būdas. Tiesa, jis yra kompensacinis. Šių genų padaugėja tik tada, kai dėl netolygaus krosingoverio arba delecijos dalis rRNR genų prarandama. Tokiu atveju dalis likusių chromosomoje rRNR genų pasišalina iš chromosomos ir replikuojasi. Tada visos kopijos įsijungia į chromosomą ir kartu su ja stabiliai perduodamos dukterinėms ląstelėms. Šis reiškinys vadinamas **magnifikacija** (lot. *magnificatio* – padidinimas). Ji būdinga ir genams, kurie lemia chromosomų histonų sintezę.

Amplifikacijos būdai. Pirmiausia buvo aptikta ne genų, lemiančių atsparumą nepalankiems veiksniams, o rRNR genų amplifikacija. DNR segmentas, koduojantis šias rRNR, iškerpamas. Toliau besisukančio žiedo būdu nuo jo kaip matricos sintetinama ilga ekstrachromosominė rDNR.

Prie nuodų prisitaikoma keturiais būdais:

- susidaro **ekstrachromosominė DNR;**
- po amplifikacijos ekstrachromosominė DNR susitelkia į smulkius mazgelius, kurie yra ne tik branduolyje, bet ir citoplazmoje; šios DNR replikacija vyksta ne tik S, bet ir kituose ląstelės ciklo tarpsniuose;
- susidaro dvigubos **mikrochromosomos** (angl. *double minute chromosomes*), smulkios, suporuotos chromosomos, neturinčios centromeros;
- **amplifikuoti genai yra chromosomoje,** bet nebūtinai tame pačiame lokuse ar net chromosomoje, kaip pradinis genas, o tai



1 2 3

3.33 pav. **Atsparumą kolchicinui lemiančio geno amplifikacija džiungarinio žiurkėno chromosomose** (remiantis B. P. Kopninu ir A. V. Gudkovu, 1982):
1 – ilga chromosoma su homogeniškai nusidažiusiu ilgu segmentu (pažymėta rodykle); *2* – daug dvigubų mikrochromosomų; *3* – ekstrachromosominė DNR (smulkūs taškeliai)

rodo, kad amplifikuoto segmento įjungimas į chromosomą gali būti antrinis įvykis: susidaro pailgėjusi chromosoma su vienodai besidažančiu ilgu segmentu (jame yra amplifikuoti genai).

Pastarieji trys būdai pavaizduoti 3.33 paveiksle.

Amplifikuotų genų likimas. Skiriama

- nestabilioji amplifikacija,
- stabilioji amplifikacija.

Tai priklauso nuo amplifikacijos būdo. Prisitaikant prie nuodo pirmaisiais trimis būdais, amplifikacija nestabili. Nestabiliausia jos forma – **ekstrachromosominė DNR.** Ji laikina net toje pačioje ląstelėje. Geriausias pavyzdys – rRNR genų amplifikacija ovocituose. Subrendusiuose ovocituose ši ekstrachromosominė DNR išnyksta. DNR mazgelius dar 1982 m. atrado B. Kopninas, bet iki šiol jų reikšmė ir ypatybės neištirtos. Ypač neaiški citoplazminių amplifikuotos DNR mazgelių paskirtis. Dvigubos mikrochromosomos stabilesnės, bet pasmerktos išnykti dukterinėse ląstelėse, nes neturi centromeros (vienoje jų telpa 2–4 *dhfr* genai).

Stabiliausia amplifikacija yra tada, kai amplifikuotas segmentas yra normalioje chromosomoje. Jeigu ląstelė su tokia chromosoma dalijasi, amplifikuotą segmentą paveldi visos dukterinės ląstelės – klonas.

Ląstelių populiacijos. Kaip ir pagal epigenetinius pokyčius, taip ir pagal genomo pertvarką somatinės ląstelės sudaro populiaciją. Geriausiai tai įrodyta *dhfr* genui.

Somatinių ląstelių populiacija susidaro iš karto pagal kelias savybes:

- pakitusių ir nepakitusių ląstelių santykį;
- amplifikacijos būdus;
- amplifikacijos laipsnį (kopijų skaičių);
- pertvarkos stabilumą;
- grįžimo laipsnį (grįžtamumą – negrįžtamumą).

Kažkuri ląstelių dalis lieka nepakitusi. Pakitusios ląstelės skiriasi amplifikuoto lokuso skaičiumi ir amplifikacijos būdais.

Nepakitusios ląstelės yra naujos genomo ar pavienių jo lokusų pertvarkos **rezervas.**

Tai savotiška organizmo strategija. Maža su kokiais aplinkos veiksniais dar teks susidurti organizmui per ilgą jo gyvenimą. Taigi ir daugumos ląstelių amplifikacija yra nestabili. Tačiau aptikta ląstelių, kuriose *dhfr* geno amplifikacija iš karto buvo stabili. Ši ląstelių dalis, matyt, svarbi ląstelės atminčiai.

Amplifikacijos išsaugojimas yra **ląstelės atminties**, arba kitaip **genų veiklos imprintingo būdas**.

Pakartotinai paveiktos nuodu ar kitu nepalankiu veiksniu, ląstelės prie jo prisitaiko greičiau, negu tos, kurios pirmą kartą sąveikauja su šiuo veiksniu.

Amplifikacijos valdymas ir genetika yra ateities problemos, nors jau dabar kyla daug svarbių klausimų:

- kodėl nepakinta lytinės ląstelės, nors jų genome yra tie patys genai, kurie amplifikuojami somatinėse ląstelėse;
- kodėl amplifikacija vyksta tik tam tikrose ląstelėse;
- ar gali būti nukrypstama nuo genų amplifikacijos tvarkos, ypač lytinėse ląstelėse?

Labai nedaug žinoma apie genus, kurie valdo amplifikaciją, tačiau akivaizdu, kad **amplifikacija** yra **valdomas reiškinys:**

- **vyksta tik tam tikrose ląstelėse,** pvz., rDNR genų – žinduolių ovocituose ir pan.;
- **nusistovėjęs santykis tarp amplifikaciją sukeliančio veiksnio ląstelių tipo ir amplifikacijos būdo.** Žinduolių ovocituose vyksta nestabiliausia amplifikacija.

Ovocitai – generatyvinės ląstelės, todėl esant stabiliai amplifikacijai ją paveldėtų palikuonys. Pirimidinų sintezės genų sankaupa, atvirkščiai, amplifikuojama tik stabiliausiu būdu – chromosomoje. Atsparumo kolchicinui atžvilgiu ląstelės labai įvairios. Net toje pačioje ląstelėje pasireiškia keli amplifikacijos būdai.

Žmogaus patologiją gali nulemti sutrikusi amplifikacija. Dėl kai kurių genų amplifikacijos atsiranda vėžys. Tai pirmiausia **onkogenų** – *c-myc, K-ras* ir kt. amplifikacija. Tačiau vėžį gali sukelti ir kitų genų – telomerazės, D ciklino amplifikacija. Pastarasis genas, kaip ir onkogenai, valdo ląstelės dalijimąsi (žr. p. 336). Chondriosarkomos ląstelėse amplifikacija aptikta net 8 lokusų, be to, įvairių ligonių skirtingų lokusų skirtingose chromosomose.

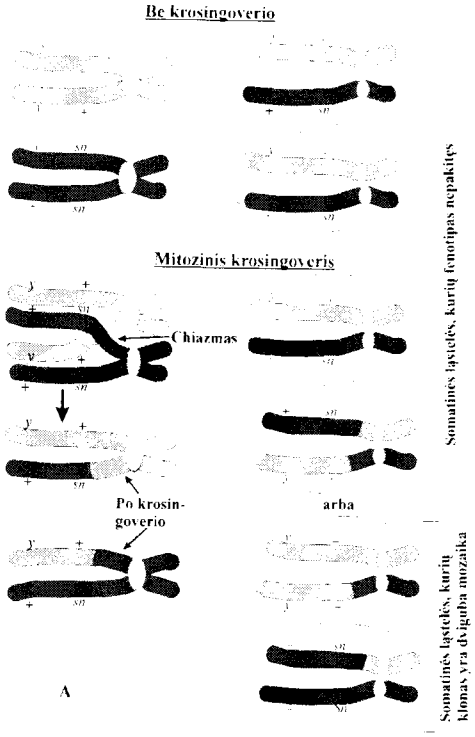
3.8.3. Lokusų vietos kaita. Somatinis krosingoveris. Mielių poravimosi tipai

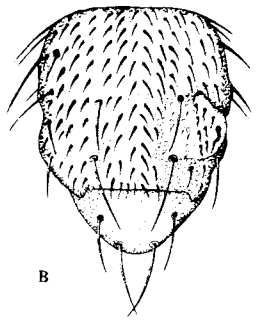
Lokusų vietos kaita yra vienas pagrindinių somatinių ląstelių genomo pertvarkos būdų. Daugeliu atvejų dėl to pakinta genų veikla, pasireiškia **padėties efektas.** Panaši pertvarka generatyvinėse ląstelėse sukelia paveldimus pokyčius – mutacijas, rekombinaciją.

Keletas šio tipo reiškinių nagrinėti. Tai netolygi euchromatino translokacija į heterochromatiną arba šalia jo, lokusų translokacija iš vidinės chromosomų dalies į subtelomerą, lokusų vietos keitimas dėl judriųjų genomo elementų ir šių elementų įsiterpimas naujoje vietoje. Šalia jų dar yra

- somatinis krosingoveris;
- kasetinė pertvarka genų, lemiančių mielių poravimosi tipus;
- inversija kaip genomo pertvarkos būdas (*Salmonella* fazių kaita).

Somatinis krosingoveris. Mejozėje homologinių chromosomų konjugacija – būtinybė, viena pagrindinių šio ląstelių dalijimosi ypatybių, bet ir mitozėje homologinės chromosomos gali suartėti. Pirmiausia tai nustatyta genetiniais metodais – atrastas **somatinis krosingoveris.**





3.34 pav. **Dviguba mozaika – somatinio krosingoverio rezultatas:** *A* – chromosomų pasiskirstymas mitozėje be krosingoverio ir po somatinio krosingoverio drozofilos heterozigotose *y+/+sn*: *B* – fenotipinis somatinio krosingoverio rezultatas – dviguba mozaika ant drozofilos krūtinėlės (arba geltonas kūnas, arba „apsvilę" šereliai)

Jį atrado 1936 m. Šternas (C. Stern). Jis tyrė drozofilos (*D. melanogaster*) hibridus, heterozigotinius pagal du genus X chromosomoje:

y (*yellow*) – geltonas kūnas, normali – pilka spalva;

sn (*singed*) – „apdeginti, apsvilę" šereliai.

Hibridinių patelių kūnas buvo pilkos spalvos su normaliais šereliais, nes abu genai (*y* ir *sn*) yra recesyvieji. Tačiau retkarčiais ant drozofilų kai kurių kūno dalių atsirado dvigubos dėmės:

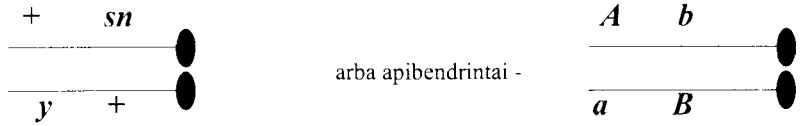
- pusė dėmės – geltonas kūnas, normalūs šereliai,
- kita pusė dėmės – normali pilka kūno spalva, „apsvilę šereliai" (3.34 pav.). Tai mozaika.

Mozaikos. Dvigubosios mozaikos po somatinio krosingoverio. Somatinių ląstelių mozaikas sukelia:

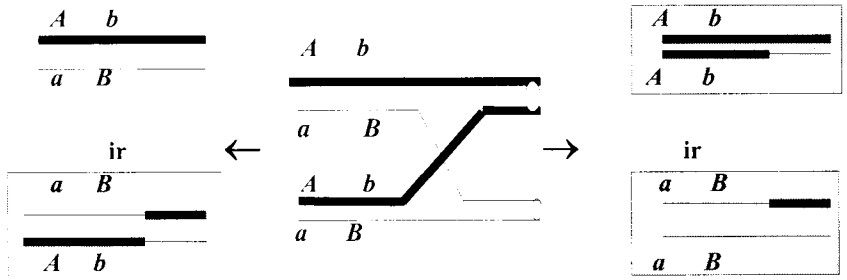
- įvairios mutacijos;
- genų veiklos pokyčiai, ypač dėl variabiliojo padėties efekto;
- somatinis krosingoveris.

Pastarasis įtikinamiausiai įrodomas **dvigubosiomis mozaikomis**. Jomis įvertinamas ir somatinio krosingoverio dažnis. Tai mozaikos, kurių pusę pakitusio lopo sudaro somatinės ląstelės su vienu recesyviuoju požymiu, kitą pusę – ląstelės su kitu recesyviuoju požymiu. Taip buvo ir hibridų *y+/+sn* (žr. 3.34 pav.). Tokios dvigubosios mozaikos atsirado dėl somatinio krosingoverio. Tačiau būtinos dvi sąlygos:

1) tam tikra alelinių genų padėtis dizigotose (heterozigotose pagal du nealelinius genus):



2) krosingoveris turi vykti tarp centromeros ir pirmojo nuo centromeros geno-žymeklio, būtent *sn+* arba *B, b*:



Abu požymiai dominuojantys

Chiazmas tarp homologinių chromosomų chromatidžių somatinėje ląstelėje

Po lygiai ląstelių, kuriose yra po vieną(*a* arba *b*) recesyvųjį požymį

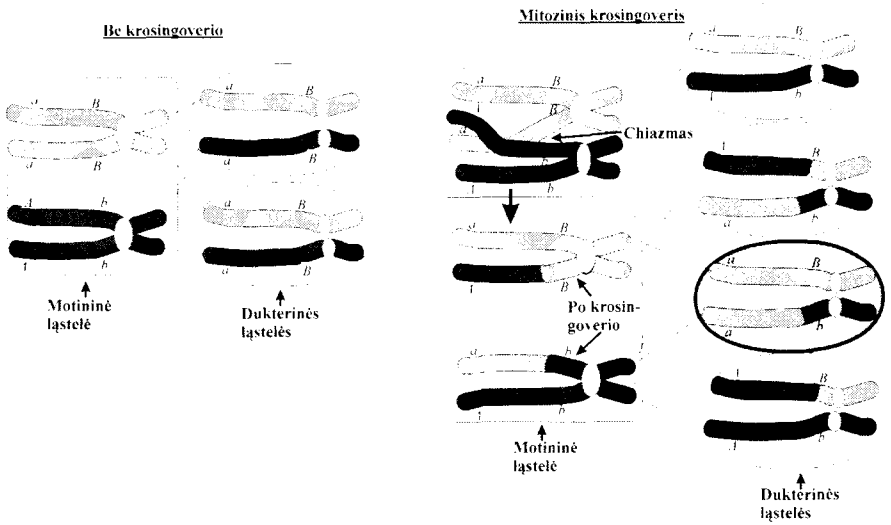
Normalioje mitozėje visos dukterinės ląstelės vienodos. Dėl somatinio krosingoverio atsiranda įvairių genotipų somatinės ląstelės, tarp jų ir tos, kurių genotipe recesyvieji genai yra homozigotinėje būklėje (*bb* arba *aa*). Jos yra kamieninės (motininės) dvigubajai mozaikai atsirasti. Krosoverinių chromosomų su vienokiu ir kitokiu genų deriniu susidaro po lygiai, todėl ir ląstelių, kurios tampa homozigotinėmis pagal *a* alelį ir pagal *b* alelį, turi būti irgi po lygiai.

Dėl somatinio krosingoverio susidaro somatinių ląstelių populiacija. **Dvigubosios mozaikos** būdingos tik somatiniam krosingoveriui.

Genetinės jo pasekmės gali būti dvejopos: pirma, susikuria somatinių ląstelių įvairovė dėl genų naujų derinių chromosomose. Antra, tai vienas iš genomo pertvarkos – geno amplifikacijos – būdų somatinėse ląstelėse. Tai svarbu ląstelių diferenciacijai. Manoma, kad tokiu būdu susidaro žinduolių raumenų ląstelių įvairovė. **Somatinis krosingoveris – vienas iš būdų somatinių ląstelių genotipų skirtumams atsirasti**. Tai pagrindinė ontogenetikos problema, kurią pirmasis bandė spręsti Veismanas.

Kiekvienos krosoverinės ląstelės (kurioje įvykęs krosingoveris) palikuonys paveldi naują genų derinį krosoverinėse chromosomose. Jos sudaro **kloną**. Klono ir mozaikos lopo dydį lemia tai, kaip anksti organizmo raidoje įvyko somatinis krosingoveris, kiek dukterinių ląstelių atsirado per tą laiką.

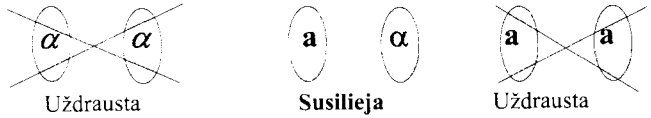
Somatinių ląstelių genotipų įvairovė susidaro ir kai vyksta **krosingoveris tarpe tarp dviejų žyminčiųjų genų** (3.35 pav.). Atsiranda skirtingo fenotipo **mozaika**, bet ji **vienguba**. Kad tai somatinio krosingoverio pasekmė, reikia įrodyti, nes, kaip minėta, lygiai tokios pat mozaikos gali atsirasti dėl mutacijų ar chromatino sandaros pokyčių.



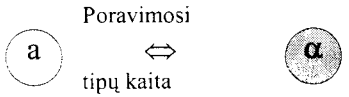
3.35 pav. **Somatinis krosingoveris tarp dviejų genų – žymeklių:** *A*, *a* ir *B*, *b* – genai-žymekliai; paryškinta dukterinė ląstelė, kurios fenotipe pasireiškia recesyvusis genas *a*, nes po krosingoverio ji tampa homozigotine (*aa*) pagal šį geną, kitų trijų galimų genotipų somatinėse ląstelėse dominuoja aleliai *A* ir *B*

Mielių poravimosi tipų kaita. Iš visų genomo pertvarkos reiškinių genetinis mielių poravimosi tipų kaitos valdymas geriausiai ištirtas.

Mielėms (*Saccharomyces cerevisiae*) būdingas **homotalizmas** (gr. *homo* – vienodas, panašus + *thallos* – auglys, atžala). Susilieja to paties gniužulo dvi ląstelės, bet **tik dviejų skirtingų poravimosi tipų, t. y. a ir α haploidinės ląstelės**.



Susidaro diploidinės a/α ląstelės. Bet kaip iš tos pačios vegetatyvinės ląstelės atsiranda dviejų skirtingų poravimosi tipų ląstelės a ir α? Mielių poravimosi tipų ypatybė yra ta, kad α gali virsti a, arba atvirkščiai: a virsta α:



MAT, HMLα ir HMRa* lokusai.** 3-iojoje mielių chromosomoje yra 3 lokusai, kurie lemia poravimosi tipą: vienas **veiklus *MAT (angl. *mating type*) ir du neveiklūs – „tylinčios" neekspresuojamos kasetės ***HMLα*** ir ***HMRa*** (angl. *homothallic left* ir *right*). Potencialiai kiekviena haploidinė mielių ląstelė turi genetinę informaciją virsti α ir a poravimosi tipais. Tačiau konkreti ląstelė yra tik vieno kurio lytinio tipo: a arba α (3.36 pav.).

> Poravimosi tipas yra tas, kurio kasetė (*HMLα* ar *HMRa*) yra *MAT* lokuse. Vieną kasetę *MAT* lokuse gali pakeisti kita; kartu gali keistis poravimosi tipai (α⇔a).

Poravimosi tipų kaitai būtinas dominuojantis genas ***HO*** (angl. *homothallism*). Šis genas koduoja endonukleazę, kuri kerpa specifines nukleotidų sekas mielių DNR. *MAT* lokuse ji padaro dvigrandį trūkį, ir po to į *MAT* lokusą įstatoma priešinga buvusiai kasetė:

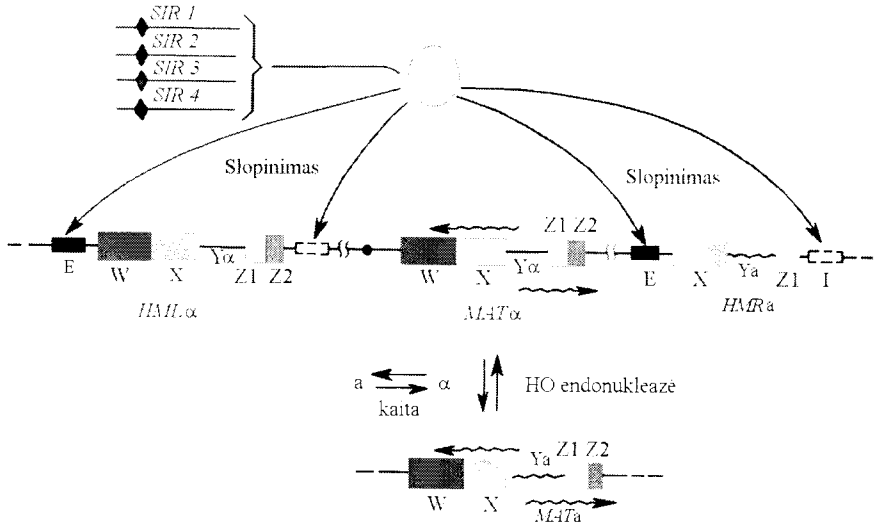
HMRa* į *MATα
arba
HMLα* į *MATa

Išlieka genetinė informacija ir tame lokuse, iš kurio (*HMR*a arba *HMLα*) kasetė perkeliama į *MAT* lokusą. Vadinasi, perkeliama tik viena DNR grandinė. Virsmas vieno tipo kitu vyksta santykiu 1:1. Tad a tipo ląstelei yra α tipo ląstelė. Kai endonukleazės genas yra recesyvusis (*nul*-mutacija), *ho* poravimosi tipų kaita vyksta labai retai, 10^{-6} dažniu.

Kasetinė vietos kaita ir jos valdymas. Tai sudėtingi reiškiniai. Pirmiausia yra genai *SIR* (angl. *silent information regulators*), kurie slopina *HMR*a ir *HMLα* „tylinčias" (neekspresuojamas) kasetes. Jų yra keletas. *SIR* genų koduojami represoriai sąveikauja su specialiomis nukleotidų sekomis, kurios abu neveikliuosius lokusus supa iš abiejų pusių ir kurių nėra veikliajame *MAT* lokuse (žr. 3.36 pav.).

Kasetinis perjungimas nėra unikalus reiškinys. Panašiai perjungiami *Trypanosoma vsg* (variabiliojo paviršinio glikoproteino) genai. Manoma, kad tokiu pat būdu valdomi homotalinių samanų ir dumblių poravimosi tipai.

Inversija kaip *Salmonella* fazių kaitos priežastis. *Salmonella* ir *Escherichia* juda žiuželiais. Didžiąją jų žiuželio dalį sudaro baltymai



3.36 pav. **Mielių *Saccaromyces cerevisiae* poravimosi tipų lokusai *HMLα*, *MATα* ir *HMR*a ir jų valdymas:**
HMLα ir *HMR*a lokusų veiklą slopina *SIR* genų produktai; jie sąveikauja su E ir I, veiklūs yra tik tie genai, kurie yra *MAT* lokuse; transkribuojami genai pavaizduoti ~~~, translokaciją atlieka HO endonukleazė

flagelinai (apie 50 kDa). Jie yra pagrindiniai paviršiniai šių bakterijų antigenai. Tik *E. coli* turi vieną flageliną, o *S. typhimurium* du, žymimus H_1 ir H_2.

Dar 1956 m. Lederbergas (J. Lederberg) ir Ino (T. Iino) aptiko įdomų reiškinį. Yra dviejų tipų to paties *S. typhimurium* kamieno ląstelės: vienos turi flageliną H_1, kitos – H_2. Ir vienos, ir kitos ląstelės vienodai turi genus, koduojančius abu flagelinus. Be to, paaiškėjo, kad nors ir retokai (10^{-3}–10^{-5} dažniu/1 ląstelių kartai), bet H1 serologinis tipas gali virsti H2, arba atvirkščiai:

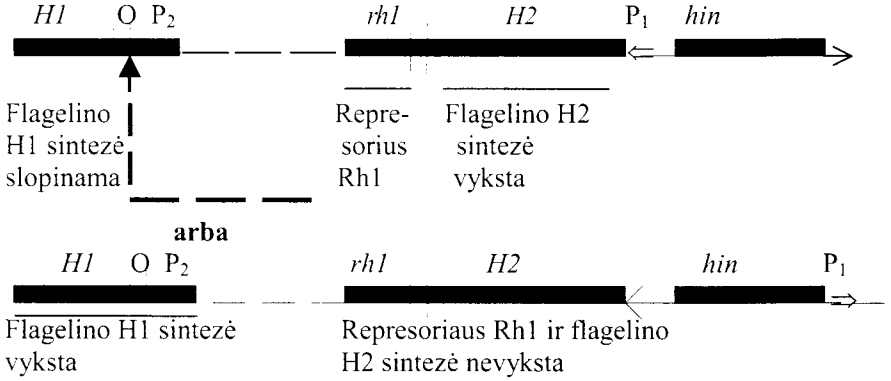
H1⇔H2

Skirtingos *S. typhimurium* serologinės būsenos vadinamos **fazėmis**.

Vieno serologinio tipo virtimas kitu vadinamas **fazių kaita.**

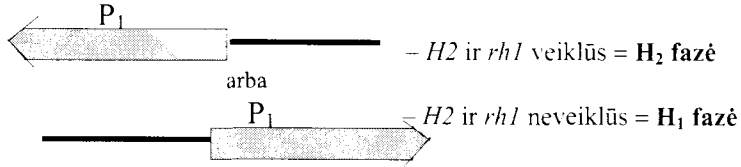
S. typhimurium nauda iš fazių kaitos yra panaši, kaip *Trypanosoma* iš *vsg* genų kaitos, – didesnis pasipriešinimas imuniniam gyvūnų atsakui į parazitą.

Flagelinų genetika ir fazių kaitos reguliacija. Abu flagelinus H_1 ir H_2 koduoja skirtingi genai, nutolę vienas nuo kito (3.37 pav.). Svarbu,



3.37 pav. **Fazių kaita – promotoriaus P_1 inversija:**
H1 ir H2 – flagelinai; *H1* ir *H2* – flagelinų genai; *rh1* – reguliacinis genas, kuris koduoja baltymą-represorių Rh1. Šis baltymas slopina flagelino geną *H1*. Jis sąveikauja su geno *H1* operatoriumi *O*. Promotorius P_1 ir genas *hin* yra judriojo genomo elemento viduje, tik šis elementas nesikilnoja iš vienos vietos į kitą, o apsiverčia (inversija) 180°. Genas *hin* koduoja baltymą (DNR invertazę), kuris atlieka elemento inversiją

ar bus aktyvus H_2 genas ir šalia esantis genas *rh1*, kuris koduoja represorių, slopinantį H_1 geno veiklą. Genai H_2 ir *rh1* veikia kartu, jų veikla priklauso nuo promotoriaus P_1 padėties. Ji gali kisti 180°:



Kai *rh1* genas neveiklus, nesigamina represorius, slopinantis H_1 geną, ir šis veikia.

Fazių kaita irgi neunikalus reiškinys. Panašiai kaitaliojasi klumpelės (*Paramecium*) poravimosi tipai arba antigenų gamyba. Antai žiuželių paviršiuje esančių antigenų sintezę koduoja net 8 branduolio genai, bet pasireiškia tik vienas. Kuris iš jų, priklauso nuo aplinkos. Įvairūs poveikiai A serotipą gali paversti B serotipu, ir atvirkščiai: B→A→B, bet kai sąlygos nekinta, serotipai yra stabilūs ir paveldimi per citoplazmą.

Įdomiausia, matyt, yra aukštesniųjų augalų fazių kaita, tik kol kas mažai tiriama. Lengviausia ją stebėti vegetatyviniu būdu dauginamų augalų. Skirtingo amžiaus arba išaugę įvairiomis sąlygomis to paties augalo ūgliai ryškiai skiriasi. Skirtumai išlieka dauginant vegetatyviniu būdu, bet, matyt, šių pokyčių prigimtis kita – **epigenetinė**. Kur kas sudėtingiau negu *Salmonella,* vyksta *Paramecium* serotipų kaita.

Dviejų virusų P_1 ir *Mu* genome invertuojami segmentai, kaip ir *Salmonella*. Priklausomai nuo invertuojamo segmento padėties kiekvienas šių nuosaikiųjų virusų užkrečia skirtingas bakterijas.

3.9. Nebranduoliniai (nechromosominiai) genomai. Nebranduolinis paveldimumas

Nebranduolinis paveldimumas – daug ginčų sukėlusi problema, kaip ir genomo epigenetiniai pokyčiai. Nepaisant to, kad prie nebranduolinio paveldimumo „lopšio" XX a. pradžioje buvo tokie žymūs mokslininkai kaip Boveri (T. Boveri), Korensas (C. Correns) ir Bauras (E. Bauer) (pastarieji du atrado plastidžių paveldimumą), ilgą laiką nebranduolinis paveldimumas (reiškinys vadinamas įvairiai: nechromosominis, citoplazminis) nebuvo viešai pripažįstamas. Tik po to, kai apie 1950–1955 m. Sonebornas (T. M. Sonneborn), Bilas (G. H. Beale), atrado ir smulkiai ištyrė įvairius *Paramecium* nebranduolinio paveldimumo reiškinius, tarp jų susijusius su kapa dalelėmis, Michaelis (P. Michaelis) nustatė citoplazminio paveldimumo svarbą tolimuosiuose augalų hibriduose, Roudsas (M. M. Rhoades) įrodė, kad vyriškas kukurūzų sterilumas paveldimas per citoplazmą, Efrusis (B. Ephrussi) aptiko mitochondrijų paveldimumą, pagaliau nebranduolinis paveldimumas buvo viešai įteisintas.

Įtampą šioje srityje gali parodyti ir toks faktas: net 4 mokslininkai išrinkti Amerikos nacionalinės mokslų akademijos nariais už darbus, susijusius su nebranduoliniu paveldimumu. Nė vienai genetikos sričiai dar nebuvo skirta tiek dėmesio šioje prestižinėje Mokslų akademijoje.

3.9.1. Specifiniai nebranduolinio paveldimumo tyrimo metodai

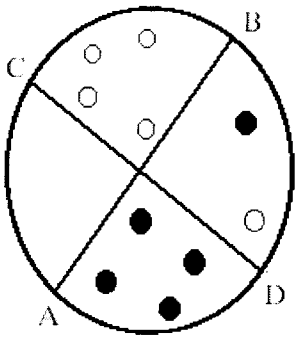
Nebranduolinio paveldimumo tyrimo problemos. Klasikiniams genetikos metodams būtinos to paties geno (požymio) alternatyvos, skirtingos formos. Alternatyvias nebranduolinių požymių išraiškas sunku aptikti dėl kelių priežasčių:

1. Nebranduolinio paveldimumo vienetai dažnai nulemia gyvybei svarbius požymius, pvz., mitochondrija yra kvėpavimo centras, ir jeigu ląstelė nekvėpuoja, ji turi žūti.

2. Chromosomose esantys genai dažniausiai yra pakartoti tik du kartus ir tolygiai pasiskirstę tarp dukterinių ląstelių, todėl nesunku išaiškinti jų genotipą ir fenotipą. Tuo tarpu nebranduolinio paveldimumo struktūros kartojasi daugybę kartų. Pvz., ląstelėje plastidžių yra nuo dešimčių iki šimtų, o mitochondrijų gali būti ir tūkstančiai. Jeigu viena kita mitochondrija ir pakistų, ląstelės savybėms tai neturėtų įtakos. Pakitusi mitochondrija degraduotų ir jos vietą užimtų normalios.

3. Jeigu mutantinės plastidės (ar mitochondrijos) ląstelėje išgyvens ir pasidaugins, joje šalia mutantinių plastidžių (ar mitochondrijų) bus normalių. Plastidės tarp dukterinių ląstelių pasiskirsto netolygiai, o mutantinės plastidės pasiskirsto atsitiktinai, todėl labai dažnai dukterinės ląstelės turi ne tik mutantines, bet ir normalias plastides. Konkuruodamos normaliosios plastidės gali dažniau dalytis ir išstumti mutantines plastides. Tik atsitiktinai gali susidaryti ląstelės su visomis mutantinėmis plastidėmis (3.38 pav.). Ir šiuo atveju daugialąstis organizmas bus mozaika – margalapis. Todėl dažnos margalapių augalų plastidžių mutacijos.

Nors aukščiau išdėstytos aplinkybės ir apsunkina tirti nebranduolinį paveldimumą, bet šiuolaikiniai molekulinės genetikos metodai leidžia apsieiti be alternatyvių geno būsenų.



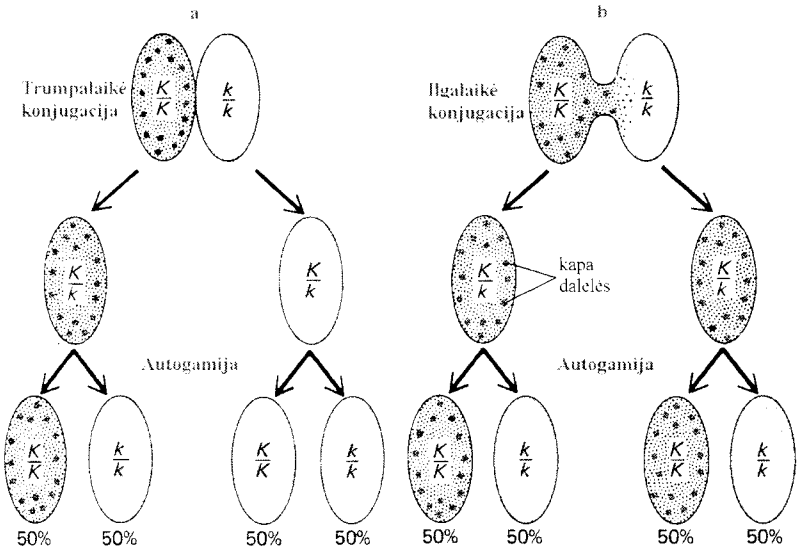
3.38 pav. **Atsitiktinis plastidžių pasiskirstymas tarp dukterinių ląstelių:**
normalios plastidės pažymėtos juodu, mutantinės – pilku skrituliukais. Linijomis AB ir CD pavaizduota citokinezė

Visoms genetinėms struktūroms, kurių genetinė medžiaga yra DNR arba RNR, taikomi tie patys nukleorūgščių tyrimo metodai, kaip ir branduolio DNR. Toli pažengta jais tiriant ir nebranduolinius genomus. Antai vienas pirmųjų visiškai sekvenuotų buvo žmogaus mitochondrijų genomas net nežinant, kokius baltymus koduoja kai kurie atvirieji (vadinamieji neidentifikuoti) skaitymo rėmeliai. Tiesa, žmogaus mitochondrijų genomas labai nedidukas (tik šiek tiek daugiau kaip 16,5 kb, žr. toliau).

Mitochondrijose ir kitose nebranduolinėse genetinėse struktūrose esančių genų alternatyvios formos (aleliai) yra būtinos, norint nustatyti funkcinę šių genų reikšmę, jų valdymą, todėl klasikiniai genetinės analizės metodai nepraradę savo vertės:

- jais, kaip ir anksčiau, aptinkami nauji nebranduolinio paveldimumo faktai ir reiškiniai;
- ląstelėje nustatomos konkrečios struktūros, kurioms būdinga genetinė autonomija, ir tik aptikus jose DNR (ar RNR) kaip genetinę medžiagą, taikomi molekulinės genetikos metodai;
- pažintinė reikšmė: klasikinių metodų pagrindą visada sudaro genetiniai reiškiniai ir dėsningumai, kuriuos reikia žinoti.

Visais atvejais nebranduolinių požymių paveldėjimui yra būdingas nukrypimas nuo tipiško tam organizmui požymio paveldėjimo, būdingo branduoliniams genams. Įvairiems organizmams taikomi saviti metodai nebranduoliniam paveldimumui nustatyti. Jie pagrįsti šių organizmų dauginimosi ir lytinio proceso ypatumais. Pvz., klumpelės (*Paramecium*) lytinis procesas yra konjugacija. Trumpalaikės konjugacijos metu apsikeičiama tik branduoliais, o ilgalaikės – ir citoplazma, todėl nebranduolinėmis genetinėmis struktūromis apsikeičiama tik vykstant ilgalaikei konjugacijai (3.39 pav.). Iš paveldėjimo ypatumų sprendžiama ir apie bakterijų nebranduolinio paveldimumo struktūras – plazmides.



3.39 pav. **Kapa dalelių paveldėjimas – trumpalaikė *a* ir ilgalaikė *b* *Paramecium* konjugacija:**
a – apsikeičiama tik mikrobranduoliais ir juose esančiais genais *K* ir *k*; citoplazma neapsikeičiama; kapa dalelių išlikimas priklauso nuo branduolio genotipo: esant veikliam *K* genui (*KK* arba *Kk* genotipai) kapa dalelės išlieka, o *kk* genotipo *Paramecium* kapa dalelės išnyksta: *b* – apsikeičiama mikrobranduoliais ir citoplazma su joje esančiomis kapa dalelėmis; šių išlikimas priklausys nuo *K* geno (žr. *a*)

Galima pasinaudoti ir savita kai kurių mutacijų fenotipine apraiška, kaip antai tirti *ts* (temperatūrinius) mutantus. Efrusis įrodė genetinę mitochondrijų autonomiją pasinaudodamas tuo, kad vienaląsčiams grybams (tarp jų mielėms) būdingi du kvėpavimo tipai: aerobinis ir anaerobinis. Dėl mutacijos sutrikus aerobiniam kvėpavimui, dar išlieka anaerobinis kvėpavimas. Mielių *Saccharomyces* mutacijos *petite* (pranc. smulkus, mažas) arba grybo *Neurospora crassa* mutacijos *poky* (angl. skurdus) yra modeliai mitochondrijų genomui tirti.

Abipusiai kryžminimai yra klasikinis metodas. Net Linėjus (C. Linne) įrodinėjo, kad esminiai, stambūs požymiai yra paveldimi iš motinos pusės, o smulkūs iš tėvo. Šių laikų terminologija tai reikštų, kad stambūs požymiai paveldimi per citoplazmą, o smulkūs – per branduolį.

Aukštesnieji eukariotai iš **motinos** paveldi ir **branduolį,** ir **citoplazmą,** o iš **tėvo** – tik **branduolį** (arba tėvo citoplazminės paveldimumo struktūros suyra). Požymis, kurį nulemiančios genetinės struktūros yra citoplazmoje, iš tėvo nepaveldimas, nes šį požymį lemiančio geno branduolyje nėra.

Tuo ir pagrįstas abipusių kryžminimų metodas. Vadovaujantis aukščiau išdėstyta taisykle, iš karto aišku, kad visi požymiai, kuriuos palikuonis paveldėjo iš tėvo, perduoti per branduolį, o tų požymių, kurie buvo paveldėti iš motinos, prigimtis neaiški: jie galėjo persiduoti arba per branduolį, arba per citoplazmą. Kurie požymiai yra paveldėti iš motinos, ir nustatoma abipusiais kryžminimais.

Kad būtų aiškiau, išnagrinėkime konkretaus citoplazminio požymio, būtent vyriško citoplazminio sterilumo (VCS) paveldėjimą, kai atliekamas abipusis kryžminimas.

Apie 1930 m. Ukrainoje M. Chadžinovas, o JAV Roudsas (M. Rhoades) aptiko kukurūzus, kuriems buvo lemtas labai svarbus ekonominis vaidmuo. Mat Antrojo pasaulinio karo metais JAV gelbėjo SSRS maisto produktais. Pasak amerikiečių genetikų, JAV savęs tuo nė kiek nesuvaržė. Visa, kas buvo išvežama, – buvo derliaus priedas, kurį ši šalis gavo iš heterozės.

Heterozė – tai hibridinė galia, reiškinys, kai hibridai-heterozigotos lenkia savo savybėmis, dažniausiai kiekybiniais požymiais, tėvus-homozigotas.

Atrodytų, kukurūzai, tam ir sutverti. Vyriški žiedynai – šluotelės ir moteriški – burbuolės auga atskirai. Kad augalas apsivaisintų gretimos linijos žiedadulkėmis, tereikia pašalinti šluotelę, t. y. paprasčiausiai ją nukirpti. O juk reikia gauti sėklos milijonams hektarų. Kiek gi reikia prikarpyti šluotelių? Net naudojant specialius įrenginius tai neįmanoma ir, svarbiausia, neapsimoka.

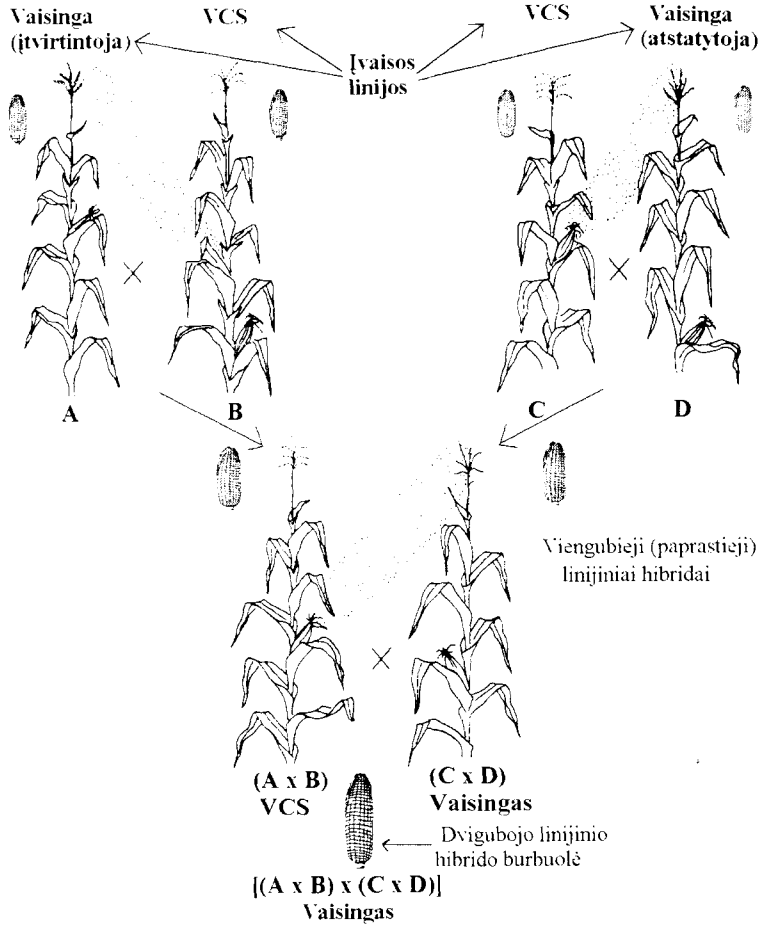
Išeitis surasta labai paprasta. Panaudotos kukurūzų linijos su vyriškais steriliais žiedynais (3.40 pav.). Teko atlikti genetinius tyrimus, nes reikėjo surasti genus, kurie atstato normalų vaisingumą.

Puikiais Roudso bandymais buvo neabejotinai įrodyta, kad vyriškas kukurūzų sterilumas paveldimas per citoplazmą, todėl jis pradėtas vadinti **vyriškuoju citoplazminiu sterilumu (VCS).** Tai įrodyta abipusiais kryžminimais. Kai VCS augalas buvo motina, o tėvinis augalas – normalus, visi pirmos kartos palikuonys (F_1) buvo sterilūs augalai:

♀ **VCS** × ♂ **N**

F_1 **VCS – visi augalai su steriliomis šluotelėmis.**

Kai motininė linija buvo normali, o tėvinei linijai buvo būdingas vyriškas sterilumas, F_1 hibridai visi buvo normalūs:



3.40 pav. **Dvigubųjų linijinių kukurūzų hibridų gavimas panaudojant vyriškąjį citoplazminį sterilumą:**
A, B, C, D – įvaisos linijos; *B* ir *C* – VCS; *A* – linija, įtvirtinanti VCS; *D* – linija, atstatanti vaisingumą, jos hibridai su VCS yra vaisingi

♀ **N** × ♂ **VCS**

F_1 **N – visi augalai normalūs.**

Čia ne klaida. Toks kryžminimų derinys iš tikrųjų buvo. Pasinaudota tuo, kad kartais pasitaiko VCS augalų, kurių dulkinėse yra šiek tiek gyvybingų žiedadulkių. Taip yra dėl vadinamosios nevisiškos genų (genetinių struktūrų) raiškos. Tai fenotipinis pokytis. Genotipas dėl to nesikeičia, todėl nevisiška raiška galima pasinaudoti atliekant genetinius tyrimus, kurie formaliai atrodytų neįmanomi. Taip buvo ir šįsyk.

Iš aukščiau pateiktų abipusių VCS ir N augalų kryžminimų būtų galima padaryti išvadą, kad VCS paveldimas per citoplazmą. Bet tai tik pirminė išvada. Hibridas (VCS×N) turi pusę chromosomų iš motinos ir pusę iš tėvo. Vyriškasis sterilumas galėjo išsivystyti (ir tai įrodyta kai kuriuose tolimuosiuose hibriduose) dėl tėvo ir motinos chromosomų neatitikimo arba tėvo chromosomų neatitikimo motinos citoplazmai. Būtina paaiškinti vieną hibridų žymėjimo taisyklę. Kai hibridas užrašomas nurodant jo tėvus, iš kurių jis kilęs, tai atliekama skliaustuose, kaip, pvz., (VCS×N). Taip iš užrašymo galima atskirti, kur yra hibridas, o kur jo tėvai.

Norint įrodyti, kad požymis tikrai paveldimas per citoplazmą, reikėjo pakeisti visas motinos chromosomas tėvo chromosomomis. Tai atliekama **grįžtamaisiais kryžminimais**. Šiuo atveju – kryžminant hibridą (**VCS×N**) su tėvine linija **N** tol, kol visos motinos chromosomos bus pakeistos tėvo chromosomomis: iš pradžių hibridas turi 1/2 chromosomų iš tėvo, po pirmojo grįžtamojo kryžminimo jų 3/4, po kito jau 7/8 ir t. t. Jeigu ir tada požymis neišnyksta, tai jis paveldimas per citoplazmą.

Kad būtų įtikinamai įrodytas citoplazminis VCS paveldėjimas ir kad po grįžtamųjų kryžminimų iš tikrųjų visos šios motinos VCS linijos chromosomos buvo pakeistos vaisingo tėvo (N) chromosomomis, Roudsas grįžtamiesiems kryžminimams kaip tėvą naudojo vaisingą liniją su visomis 10-čia citologiškai žymėtų chromosomų. Su ja kryžmino tol, kol visos motinos normalios chromosomos buvo pakeistos citologiškai žymėtomis tėvo chromosomomis, t. y. skyrėsi nuo normalaus kariotipo chromosomų. Hibrido (VCS×N) požymis ir po to neišnyko, vadinasi, jis neabejotinai paveldimas per citoplazmą.

Abipusių kryžminimų skirtumų priežastys. Ne visuomet abipusių kryžminimų skirtumai rodo nebranduolinį paveldimumą. Skirtumai gali būti:

- dėl nebranduolinio paveldimumo,
- „sankibos" su lytimi (kai genas yra tik X chromosomoje),
- motininio efekto (matroklinijos).

Motininio efekto (matroklinijos) priežastys yra kelios:

1. Tėvo branduolio genai pirmaisiais raidos etapais būna neveiklūs. Veiklūs būna tik motinos branduolio genai, todėl palikuonio fenotipas (išvaizda) gali neatitikti jo genotipo. Tarkime, kai tėvas yra *AA*, o motina *aa*. Palikuonio genotipas *Aa*:

aa × *AA*

Aa

Palikuonis turėtų būti fenotipo, lemiamo *A* geno, bet yra atvirkščiai. Jo fenotipas atitinka motinos fenotipą – pasireiškė *a* genas.

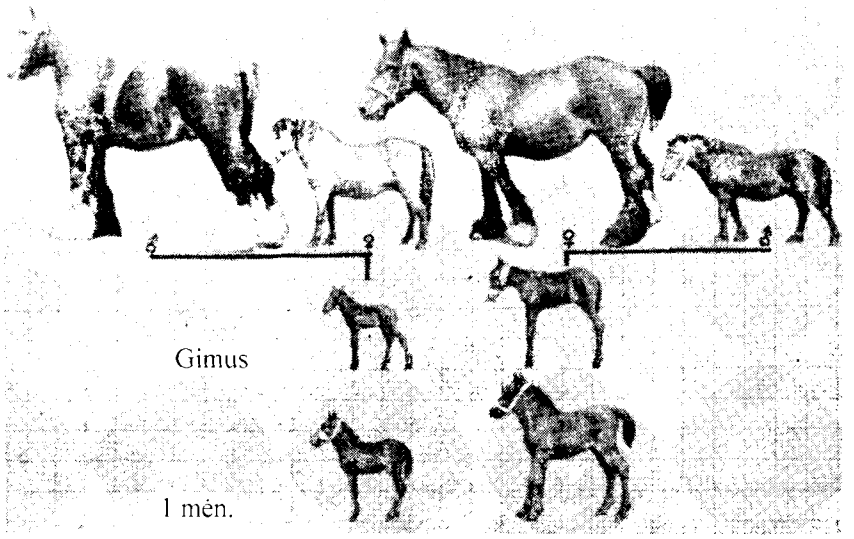
2. Gali susidaryti ilgalaikiai motinos branduolio veiklos produktai, kurie būna aktyvūs ir vėlesniais etapais. Tai sąlygoja preadaptaciją. Pavyzdžiui, sraigių spiralės kryptis priklauso nuo motinos savybių, net dominuojantys tėvo genai pasireiškia viena karta vėliau.

3. Grynai motinos organizmo poveikis besivystančiam gemalui. Tai būdinga visiems gyvavedžiams, pirmiausia žinduoliams. Iliustracijai galima pateikti normalaus dydžio arklių kryžminimus su škotiškais poniais (3.41 pav.).

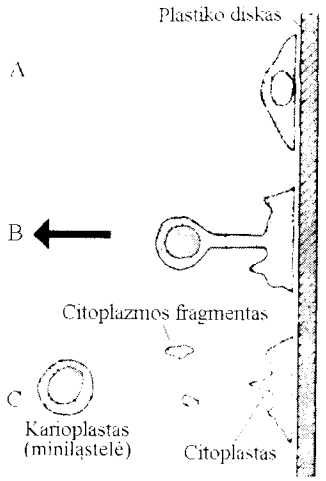
Hibridai „citoplazma+branduolys". Idealiausias būdas nebranduoliniam paveldimumui tirti yra gauti hibridą „citoplazma+branduolys" (citoplazma yra vieno organizmo, branduolys – kito). Tai pasiekiama įvairiais būdais, net aukščiau aprašytais grįžtamaisiais kryžminimais. Vienas iš būdų yra merogenezė (gr. *meros* – dalis + *genesis* – kilmė).

Merogenezė – tai bebranduolės kiaušinio dalies apvaisinimas ir gemalo vystymasis iš šios dalies.

Jūrų ežio kiaušinius mechaniškai galima susmulkinti į gabalus, kurių dalis bus be branduolio. Toks gabalas apvaisinamas spermatozoidu,



3.41 pav. **Motininis efektas. Abipusiai poni kryžminimai su normalaus dydžio arkliais** (remiantis F. B. Hutt, 1964)



3.42 pav. **Citoplastų ir karioplastų gavimas panaudojant citochalaziną B:** *A* – ląstelė ant objektinio stiklelio prieš centrifuguojant; *B* – dėl poveikio citochalazinu **B** ir centrifugavimo susidariusi išauga, kurioje yra ląstelės branduolys; *C* – išauga, jai tįstant, nutrūkusi – susidaręs karioplastas ir citoplastas

ir iš jo pradeda vystytis gemalas. Nors individas nesubręsta, bet dalį požymių (ankstyvojoje embriogenezėje) galima ištirti.

Branduolių persodinimas. Tai tobuliausias būdas hibridui „citoplazma + branduolys" gauti. Branduoliai persodinami įvairioms amfibijoms, pirmuonims, žinduoliams, dumbliams *Acetabularia*. Iš šių organizmų patogu mikromanipuliatoriumi pašalinti branduolį iš vienos rūšies ląstelių ir į tokias bebranduoles ląsteles perkelti svetimą (kitos rūšies) branduolį. Atlikus tokią operaciją dumbliams *Acetabularia*, kepurėlė vystėsi tos rūšies, kurios buvo branduolys (žr. 1.1 pav.).

Citoplastų suliejimas su karioplastais daromas įvairiais tikslais, atliekant įvairius tyrimus, ne tik tiriant nebranduolinį paveldimumą. Citoplastai – bebranduolės ląstelės, o karioplastai (miniląstelės) turi branduolį ir labai nedaug citoplazmos. Ir vieni, ir kiti gaunami dirbtinai.

Paveikus ląsteles iš grybo *Helminthosporium dematioideum* išskiriama medžiaga citochalazinu B ir po to jas centrifuguojant, branduolys atsiduria citoplazmos išaugoje, kuri vis labiau tįsta, kol pagaliau prie ląstelės pagrindo ją laiko tik siauras stiebelis (3.42 pav.). Jam nutrūkus, likusi dalis lieka be branduolio. Surenkamos ne tik bebranduolės ląstelės, bet ir karioplastai.

Cibridai. Citoplastai naudojami cibridams, ląstelėms (kartais ir organizmams) hibridine citoplazma gauti. Bet kartais gali veikti ilgalaikės RNR, kurios pasigamina ląstelės branduolyje ir patenka į citoplazmą dar prieš susidarant citoplastui.

3.9.2. Eukariotų ląstelės organoidų genomai

3.9.2.1. Mitochondrijų genomas

Mitochondrijų genomo apibūdinimas. Genetinį mitochondrijų savarankiškumą, kaip minėta, nustatė Efrusis 1949 m., bet intensyviai mitochondrijų genai pradėti tirti tik 1963 m., kai mitochondrijose aptikta DNR. Jau 1981 m. žmogaus, mielių mitochondrijų DNR buvo visiškai sekvenuota.

Daugumos organizmų mitochondrijų DNR (žymima mtDNR) molekulės yra žiedinės, bet kai kurių organizmų *Tetrahymena, Paramecium, Hydra* mtDNR yra linijinė. Organizmai labai skiriasi mtDNR dydžiu:

- augalų – 180–2400 kb,
- grybų-mielių – 18–108 kb,
- stuburinių – 15–18 kb,
- žmogaus – 165639 bp.

Tad tik stuburinių mtDNR dydis maždaug vienodas.

Labai skiriasi organizmai ir pagal bendrą mitochondrijų genomo sandarą. Žmogaus ir kitų stuburinių mitochondrijų genomas sudaro **vieną sankibos grupę**. Tai atitinka vieną chromosomą. Tačiau vienoje mitochondrijoje yra 1–8 mtDNR kopijos, o iš viso mtDNR kopijų vienai ląstelei 1100–8800. *Trypanosoma brucei* turi 20–50 stambių ir iki 10000 smulkių molekulių, sudarančių sudėtingą kompleksą iš sunertų žiedų – **kinetoplastą**.

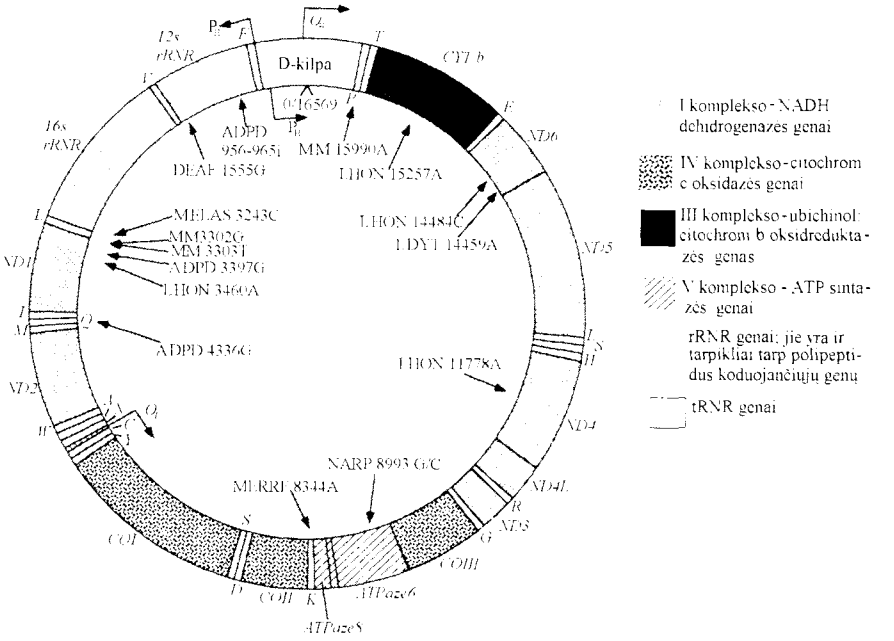
Daugumos organizmų mtDNR nesudaro nukleosomų, bet yra jų kompleksai su baltymais. Be to, kiekviena mtDNR molekulė specialiomis sekomis (D kilpa) jungiasi su vidine mitochondrijos membrana.

Mitochondrijų genai. Mitochondrijų ir chloroplastų DNR koduoja tik RNR ir baltymus, reikalingus šių organoidų veiklai. Tačiau jų nepakanka šių genetinių struktūrų sandarai ir veiklai. Antai žmogaus mtDNR yra 37 genai. Jie koduoja 22 rRNR, 13 polipeptidų subvienetų, tarp jų citochromoksidazės I, II ir III subvienetus, ATP-azės 6-ą ir 8-ą subvienetus, septynis NADHdehidrogenazės komplekso ir citochromo b subvienetus. Tai sudaro tik 5% mitochondrijų reikmių. Visus kitus baltymus, ir jų subvienetus koduoja branduolio DNR. Šie baltymai sintetinami citoplazminėse ribosomose ir pernešami į mitochondrijas.

Augalų, pirmuonių mitochondrijose pirminis transkriptas (preRNR) redaguojamas, todėl jų DNR yra genai, koduojantys RNR-gidus.

Mielių mtDNR yra 5 kartus ilgesnė negu žmogaus, bet genų joje tiek pat. Kaip tokioje trumputėje molekulėje, kaip žmogaus mtDNR, telpa tiek daug genų ir kur eikvojamas mielių genomas?

Genetinė mitochondrijų genomo sandara. Genetiniu atžvilgiu žmogaus mitochondrijų DNR yra labai „ekonomiška". Tai nebūdinga net branduolio chromosomoms. Nuo visos DNR sintetinasi tik viena bendra RNR, turinti tik vieną promotorių. Kitokių valdymo sekų nėra. Pirminis RNR transkriptas sukarpomas į atskiras RNR. Tarpikliai tarp rRNR ir polipeptidus koduojančių genų yra tRNR. Taigi nekoduojančių nukleotidų sekų žmogaus mtDNR beveik nėra. Tuo tarpu daugelio grybų, augalų mitochondrijose didelę genomo dalį sudaro nekoduojančios DNR sekos. Daugiausia tai ilgos AT porų sankaupos ir trumpos CG salelės. Mielių mtDNR yra 8 replikonai, o žmogaus – tik po vieną kiekvienai DNR grandinei.



3.43 pav. **Žmogaus mitochondrijų genomas:**
išorėje – genai; viduje – rodyklėmis nurodyti saitai, kurių mutacijos sukelia paveldimas ligas, ir kai kurių tRNR genai

Žmogaus mitochondrijų genome pakaitomis koduoja tai viena, tai kita DNR grandinė (žr. 3.43 pav.). Dalis geno, koduojančio ATP'azės šeštą subvienetą, iš dalies užeina ant kito geno, taigi yra **sanklotinių genų**. Taupoma genetinė medžiaga ir vykstant transliacijai (polipeptido sintezei ant mRNR ribosomose). Nėra sekų, kuriomis mRNR pažįsta ribosomas. Polipeptido sintezės pabaigos signalas yra UAA kodonas, tačiau DNR turi tik po vieną dvi šio kodono nukleotidų poras. Kita UAA kodono dalis panaudojama iš poliA, kuri prijungiama bręstant RNR. Transliacijos metu ta pati tRNR pažįsta ne vieną, o 2–4 kodonus. Nevienareikšmis kodas toks ryškus, kad žmogaus mitochondrijose transliacijai užtenka 22 tRNR, mielių – 25 tRNR.

Prisiminkime, ir kad mitochondrijų genomo genetinis kodas neuniversalus.

Mitochondrijų genų sąveika su branduolio genais. Ji vyksta ne tik per bendrus produktus, bet ir per valdymo genus. Kaip minėta, surasti genai, kurie atstato kukurūzų VCS augalų normalų vaisingumą. Tai dominuojantys branduolio genai *Rf* (angl. *reversion of fertility*). Jie vienodai pasireiškia, ar būtų homozigota *RfRf*, ar heterozigota *Rfrf*:

♀ ***rfrf*** × ♂ ***RfRf***
VCS linija **Linija, atstatanti vaisingumą**

Rfrf
Vaisingi palikuonys

Augalų mitochondrijose atrastos plazmidės, kurios gali lemti vyriškąjį citoplazminį sterilumą. Branduolio genai neleidžia joms įsiterpti į mitochondrijų genomą.

VCS genetika nėra tik kukurūzams būdingas reiškinys. Panašiai paveldima per 140 ištirtų augalų rūšių VCS.

Mitochondrijos ir paveldimos žmogaus ligos. Dėl mutacijų mtDNR kyla įvairios lėtinės, degeneracinės smegenų, širdies raumenų ir endokrininių liaukų ligos. Taip yra todėl, kad:

- mitochondrijos yra energiniai ląstelės centrai, ATP sintezės vieta; sutrikus aprūpinimui energija, sutrinka visi ląstelės procesai;
- mtDNR mutacijos yra labai dažnos; žmogui senstant, jos kaupiasi somatinėse ląstelėse.

Bet kaip ir kiti somatinių ląstelių pokyčiai (epigenetiniai, genomo pertvarka), taip ir mutacijos somatinėse ląstelėse yra tik konkretaus organizmo problema: palikuonys jų nepaveldi.

Tačiau nuolat daugėja sąrašas paveldimų ligų, atsirandančių dėl mtDNR genų mutacijų. Pirmosios ligos buvo reti sindromai, kaip Leberio paveldima optinė neuropatija ar miokloninė epilepsija. Yra paveldimų ligų, kurias sukelia mutacijos netgi tokių genų, kurie anksčiau su žmogaus patologija nebuvo siejami, pvz., pernašos RNR genų mutacijos. Antai trumputėje 29 bp ilgio leucino tRNR – **tRNR^{Leu}** geno atkarpėlėje tarp 3243 ir 3271 n.p. jau aptiktos 4 mutacijos – nukleotidų porų pakaitos, lemiančios 3 gana skirtingas ligas:

- 3243bp – **A→G** = encefalopatija (galvos smegenų liga), pieninė acidozė (parūgštėjimas), panašūs į apopleksiją priepuoliai;
- 3250bp – **T→C** = mitochondrinė miopatija (raumenų liga, pirminė);
- 3260bp – **A→G** = motininė miopatija ir kardiomiopatija (širdies raumens liga);
- 3271bp – **T→C** = taip pat encefalopatija (galvos smegenų liga), pieninė acidozė (parūgštėjimas), panašūs į apopleksiją priepuoliai.

Dėl genų mutacijų susergama minėtąja miokloninė epilepsija (nuomariu), pakinta raumenų skaidulos. Leberio paveldima optinė neuropatija yra įvairios genetinės prigimties. Ją sukelia mutacijos įvairių mtDNR genų, kurie koduoja **NADH** dehidrogenazės 1, 2, 4, 5 ar 6 subvienetus, citochromoksidazės I subvienetą.

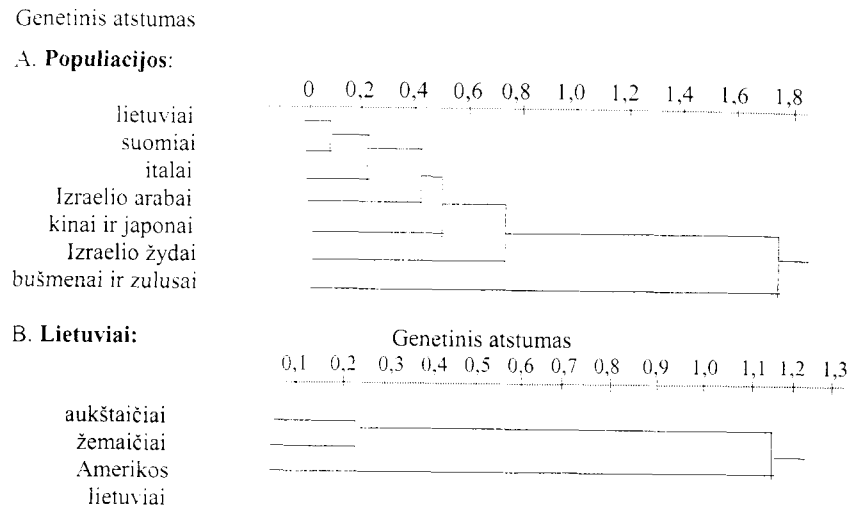
Dėl dažnų mtDNR mutacijų susidaro **didelė mtDNR įvairovė, polimorfizmas.** Šiuo reiškiniu remiamasi tiriant žmogaus populiacijas ir sprendžiant žmogaus rūšies evoliucijos problemas, konkrečiai – žmogaus rasių evoliuciją.

Mitochondrijos ir žmogaus rasių evoliucija. Apie geno/genomo evoliuciją galima spręsti keliais būdais: iš DNR homologijos (tapatumas), išreiškiamos procentais pagal DNR nukleotidų sekas, ir iš evoliucijos periodo vieneto.

> **Evoliucijos periodo vienetas** (EPV) – tai milijonai metų, per kuriuos aminorūgščių sudėtis baltyme pasikeičia 1%. Mitochondrijų DNR genų EPV labai trumpas: 0,25–0,5.

Jis dešimt kartų trumpesnis už hemoglobino genų EPV. Pvz., pasinaudojant EPV, buvo nustatyta, kad dabartinės žmogaus rasės kilusios iš pirmtako, gyvenusio Afrikoje tik prieš 140–280 tūkstančių metų.

Pasinaudodami dideliu mtDNR polimorfizmu, V. Kučinskas ir V. Vitkienė ištyrė lietuvių etnines grupes: žemaičius ir pietų, rytų bei vakarų aukštaičius, palyginimui – JAV lietuvius. Polimorfizmas



3.44 pav. **Filogenija pagal mtDNR:**
A – lietuvių populiacijos, lyginant su kitomis populiacijomis; *B* – pagrindinių etninių Lietuvos grupių (pagal V. Kučinską, 1997; 1998)

įvertintas pagal DNR restrikcinių (suskaldžius restriktazėmis) fragmentų ilgį.

Nors Lietuva buvo kryžkelėje tarp rytų ir vakarų, šiaurės ir pietų, bet pagal mtDNR lietuvių populiacija homogeniška (tapati). Ji homogeniškiausia iš visų kaukazoidinių populiacijų. Žemaičiai yra vienodžiausi tarp lietuvių (3.44 pav., *A*), o lietuvių populiacija artimiausia suomių (3.44 pav., *B*). Latvių ir estų populiacijos nebuvo tirtos.

Kaip ir buvo galima tikėtis, JAV lietuvių mtDNR polimorfizmas didžiausias.

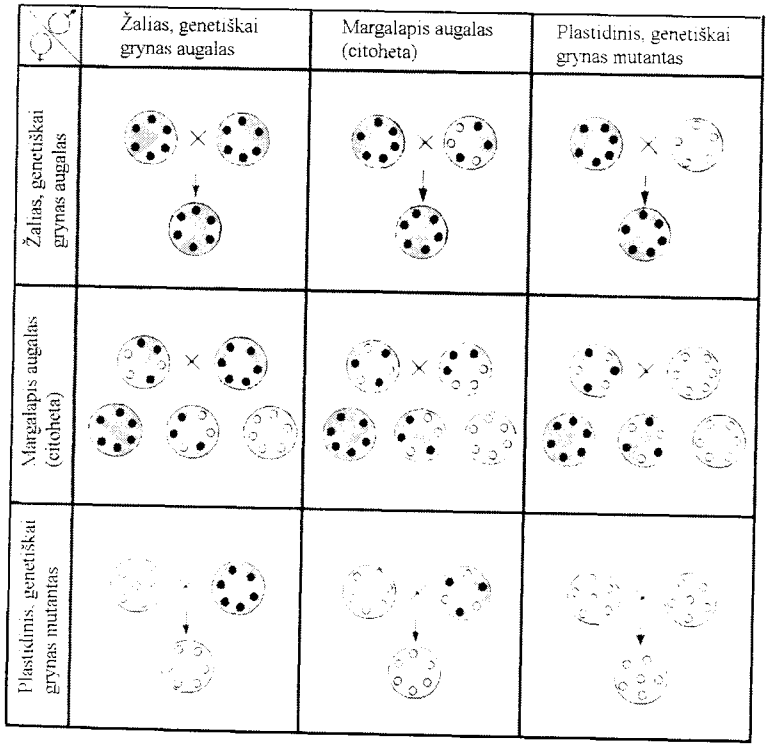
3.9.2.2. Plastidžių (chloroplastų) genomas

Plastidžių paveldimumą 1908 m. išaiškino Baueris ir Korensas, tirdami margalapių augalų paveldėjimą. Plastidės geba reduplikuotis. Kaip ir mitochondrijose, jose yra DNR. Įvairios plastidžių mutacijos lengviau aptinkamos negu mitochondrijų mutacijos. Mat jos dažnai susijusios su pigmentų sintezės pokyčiais, todėl lengvai nustatomos pagal fenotipą. Be to, jos dažnesnės, nes ląstelėje plastidžių daug mažiau negu mitochondrijų, todėl dažniau susidaro ląstelės su grynai mutantinėmis plastidėmis (žr. 3.45 pav.).

Plastidinio paveldėjimo ypatumai. Plastidžių genų nulemiami požymiai yra paveldimi tik iš motininių augalų, nors retkarčiais (iki 0,2% dažniu) aukštesniųjų augalų plastidės gali persiduoti ir per spermius. *Chlamydomonas* gametos yra vienodo dydžio, bet zigotose vieno genomo chloroplastai suyra. Panašus reiškinys vyksta ir aukštesniųjų augalų mikrosporose (žiedadulkėse). Tačiau išauginus haploidinius augalus (su vienu chromosomų rinkiniu – n) iš nesubrendusių žiedadulkių (kai jose vyksta pirmoji mitozė), išauga ir žalių haploidų.

Kadangi aukštesniųjų augalų ląstelėse plastidžių yra daug ir jos pasiskirsto netolygiai, galima išskirti 3 augalų tipus: a) su normaliomis plastidėmis, b) su mutantinėmis plastidėmis ir c) cibridus su normaliomis ir mutantinėmis plastidėmis. Kai cibridas yra motininis augalas, galima tikėtis trijų fenotipų palikuonių (3.45 pav.).

Plastidžių DNR telpa daugiau genetinės informacijos negu mitochondrijų DNR. Ji 8 kartus ilgesnė už žinduolių mitochondrijų DNR, vidutiniškai:



3.45 pav. **Plastidžių požymių (lapų spalvos) paveldėjimas**

- aukštesniųjų augalų – apie 140 kb;
- žemesniųjų augalų – apie 200 kb.

DNR yra žiedinė. Kiekviename chloroplaste yra nuo 10 iki 50 DNR molekulių. Įvairių augalų chloroplastų genomo sandara skirtinga, bet bendrais bruožais artima branduolio genomo sandarai. Plastidžių DNR yra reguliuojančios netranskribuojamos sekos, tarpikliai, vyksta pre-RNR brendimas ir splaisingas, genų viduje aptikta intronų.

Chloroplastų genai. Tipiška chloroplastų DNR turi apie 120 genų. Ji koduoja visas autonominei baltymų sintezei būtinas tRNR ir rRNR, apie 50 baltymų, tarp jų RNR polimerazę ir keletą ribosominių baltymų. Kaip ir mitochondrijų, chloroplastų DNR pirmiausia nulemia sintezę baltymų, dalyvaujančių fotosintezėje ir įeinančių į plastidės struktūrą, svarbiausia „I frakcijos" baltymą (arba ribuliozo-1,5-difosfatkarboksilazę), sudarytą iš dviejų subvienetų: didžiojo ir mažojo. Tai ypač svarbus augalų baltymas. Jis sudaro apie 40% visų augalo baltymų ir yra pagrindinis fotosintezės fermentas (jo funkcija fiksuoti CO_2). Chloroplastų DNR koduoja šio fermento didžiojo subvieneto polipeptidinę grandinę. Mažasis subvienetas koduojamas branduolyje. Vadinasi, ir dalis plastidžių baltymų yra paveldima per branduolį.

3.9.3. Plazmidės – nechromosominės genetinės bakterijų struktūros, jų įvairovė. Plazmidės kaip vektoriai genų inžinerijoje

Plazmidžių yra aptinkama ir eukariotų (mielių, augalų ir kt.) ląstelėse. Antai, kaip minėta, plazmidės lemia augalų vaisingumą – VCS (vyriškąjį citoplazminį sterilumą). Kai kurios eukariotų genetinės struktūros balansuoja ant ribos tarp privalomų genetinių struktūrų ir parazitizmo (žr. 3.8.4).

Iki šiol nėra vieningo požiūrio į plazmidžių prigimtį. Dvi kraštutinės nuomonės yra tokios:

- plazmidė yra **parazitinė DNR** ar bent **molekulinis simbiontas**;
- plazmidė yra **papildoma bakterijų chromosoma, daugiachromosominio genomo užuomazga.**

Su parazitinėmis infekcinėmis struktūromis plazmides sieja tai, kad jos gali **pereiti iš vienų ląstelių į kitas** ir, kaip nuosaikieji virusai, **būti dvejopos būklės:**

- **autonominės;**
- **integruotos,** įsijungusios į chromosomą. Plazmidės, kurios geba įsiterpti į chromosomą, vadinamos **episomomis.**

Bendrosios plazmidžių savybės ir tipai. Tipiniu atveju ląstelėje yra 10–20 to paties tipo plazmidžių. Daugelis jų smulkios. Jos sudaro tik 0,05–0,1% bakterijos chromosomos. Plazmidės, sudarančios 1% bakterijos chromosomos, jau yra stambios. Pasitaiko ir itin stambių plazmidžių. Tokių turi *Agrobacterium* – 140–240 kb ilgio. Stambiausių plazmidžių surasta mikorizės grybuose. Ten jos prilygsta ketvirtadaliui jų branduolio genomo.

Plazmidės yra žiedinės ekstrachromosominės DNR molekulės, kurioms būdingas genetinis savarankiškumas: turi DNR replikacijos pradžiai ir integracijai reikalingus genus. Dažniausiai turi ir genus, lemiančius kitas ląstelės savybes.

Savarankiška DNR replikacija, tiksliau jos pradžia, – visų autonominių genetinių struktūrų ypatybė. Pagal ją plazmidės skirstomos į dvi grupes:

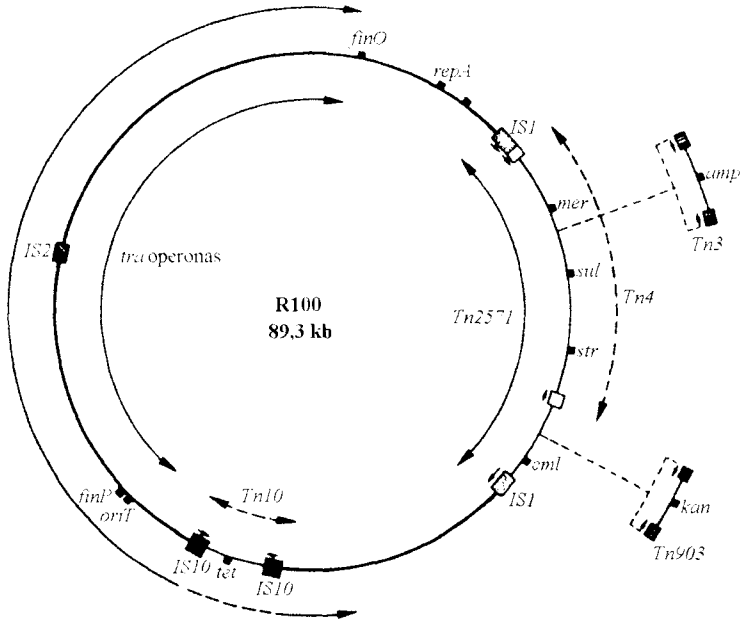
- mažakopijinių,
- daugiakopijinių.

Mažakopijinių plazmidžių DNR replikacija yra griežtai suderinta su bakterijos chromosomos DNR replikacija: 1 chromosomos kopija – 1 plazmidės kopija. Kitaip yra daugiakopijinių plazmidžių. Jų kopijų ląstelėje yra daug, ir jų DNR replikacija nesutampa su chromosomos DNR replikacija.

Plazmidžių DNR replikacija vyksta panašiai kaip ir bakterijų chromosomos DNR replikacija. DNR tvirtinasi prie ląstelės membranos. Manoma, kad prisitvirtinimo vietų skaičius membranoje ir nulemia tai, kiek bus ląstelėje plazmidžių kopijų.

Plazmidžių pernaša iš vienų bakterijų į kitas – kita plazmidžių ypatybė. Tačiau ji būdinga ne visoms plazmidėms. Šią savybę turinčios plazmidės, vadinamos **konjugacinėmis**. Nesugebančios pereiti iš ląstelės į kitą ląstelę plazmidės vadinamos **nekonjugacinėmis.**

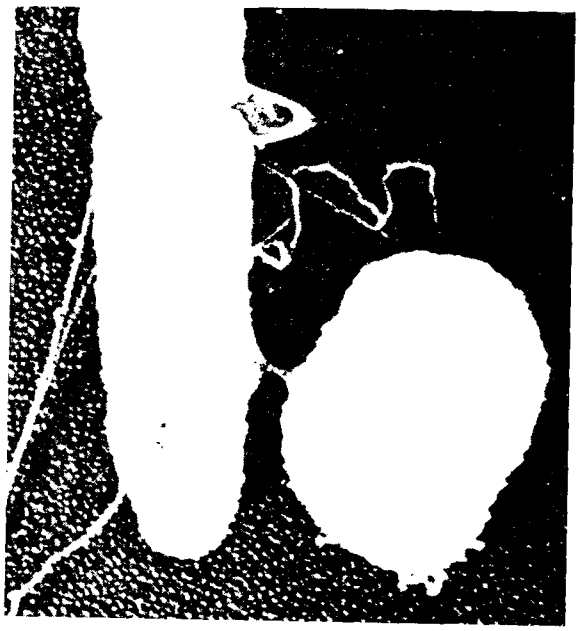
Konjugacinės plazmidės turi genų sankaupą (operoną) *tra* (angl. *transfer*), kuri koduoja plazmidės pernašą (3.46 pav.). Taip pat yra



3.46 pav. **Plazmidės R100 genolapis:**
tra operonas (*traA-traL*) – plazmidės pernašos genai, *finO, finP* – pernašos valdymo genai, *oriT* – pernašos pradžios seka, *repA* – DNR replikacijos genas; atsparumo genai: *mer* – gyvsidabrio jonams, *sul* – sulfonamidui, *str* – streptomicinui, *cml* – chloramfenikoliui, *tet* – tetraciklinui, *kan* – kanamicinui; IS1, IS2, IS10 – insercinės sekos; Tn10, Tn3, Tn4, Tn2571, Tn903 – transpozonai

valdymo genų. Vieni jų aktyvina pernašą, kiti ją slopina. Apie pusę *tra* genų lemia pilę – ilgą ataugą (apie 30 mM), kuria „užkabinama" ir priartinama kita bakterija (3.47 pav.). Pilę pašalinus, konjugacija nevyksta. Tada plazmidės iš vienos ląstelės į kitą nepernešamos. F veiksnys (taip tradiciškai vadinama ši pirmoji atrasta bakterijų plazmidė) pasižymi neįprasta savybe. Visos ląstelės, kurios turi šią plazmidę (vadinamos F^+), turi ir pilę. Kitų konjugacinių plazmidžių *tra* genų sankaupos veikla dažniausiai yra slopinama, todėl pilė susidaro retai (tik apie 0,1% ląstelių).

Pernašos pradžia panaši į plazmidės DNR replikacijos pradžią. Plazmidė pirmiausia prisitvirtina prie bakterijos vidinės membranos. Vieno iš *tra* genų produktas perkerpa vieną DNR grandinę. Ši vieta yra pernašos pradžia ***ori T*** (angl. *origin of transfer*). Susidaro linijiška DNR, kurios viena grandinė pereina į kitą bakteriją. Taigi donorinėje



3.47 pav. **Bakterijų konjugacija:**
ląstelės sujungtos konjugacinio tiltelio; pailga ląstelė – Hfr, iš jos ilga išauga – pilė; apvali ląstelė – F⁻

ląstelėje ir recipientinėje ląstelėje yra po vieną plazmidės DNR grandinę. Jos replikuojasi, ir atsistato žiedinė plazmidė.

Integracija į bakterijos chromosmą būdinga tik episomoms. F veiksnys yra episoma. Plazmidės įsiterpia į bakterijos chromosomą per IS sekas. Tokias pačias sekas turi ir bakterijos chromosoma, todėl tarp plazmidės IS ir jai komplementarios bakterijos chromosomos IS susidaro heteroduplekas.

> **Heteroduplekas** – hibridinė DNR molekulės dalis, kurios viena grandinė yra iš vienos DNR molekulės, antra – iš kitos DNR molekulės. Jis susidaro dviem DNR molekulėms jungiantis komplementariomis grandinėmis.

Heteroduplekso vietoje plazmidė įsiterpia į bakterijos chromosomą. Transpozonai gali įsiterpti į bakterijos chromosomą įvairiose vietose. Integruota plazmidė replikuojasi kartu su bakterijos chromosoma. Bakterijoms konjuguojant, tokia plazmidė nepersiduoda recipientinėms ląstelėms, nes konjugacinis tiltelis labai lengvai nutrūksta.

Įsiterpus plazmidei į chromosomą, bakterija įgyja naujų savybių, gali pakisti ir bakterijos, ir plazmidės genų veikla. Pavyzdžiui, įsiterpusi F plazmidė bakterijų rekombinaciją padidina šimtus kartų. Dėl šios priežasties bakterijų kamienai, kuriuose F veiksnys yra įsiterpęs į bakterijos chromosomą, žymimi ***Hfr*** (angl. *high frequency of recombination*).

Plazmidei pereinant iš integruotos būklės į autonominę, bakterijos genai gali į ją įsiterpti. Autonominėje būklėje šie genai pernešami iš vienų ląstelių į kitas. Tai vyksta ne tik tarp giminingų, bet kartais ir tarp labai tolimų bakterijų, pavyzdžiui, iš *Escherichia coli lac*-operonas perneštas į fotosintezę atliekančias bakterijas *Rhodopseudomonas sphaeroides* arba net į mikoplazmą *Mycoplasma caprisolium*.

Plazmidžių įvairovė pagal koduojamas savybes. Plazmidės skirstomos į grupes ir pagal koduojamus požymius. Jų genai koduoja įvairiausias bakterijų savybes. Tik F, Col, R plazmidės tarp bakterijų yra labiausiai paplitusios ir geriausiai ištirtos.

F veiksnys – pirmoji bakterijų plazmidė, kurią 1961 m. ištyrė Žakobas (J. Jacob) ir jo bendradarbiai. Tai itin svarbi plazmidė, nes jos genai lemia genetinę rekombinaciją ir lytinius tipus.

Col plazmidės koduoja paviršinius baltymus kolicinus. **Kolicinai** – tai paviršiniai toksinai, kuriais vienos bakterijos naikina kitas tos rūšies bakterijas. Jautrios bakterijos kolicinų negamina arba gamina kitokio tipo kolicinus, bet neturi imuniteto pirmojo tipo kolicinams.

R plazmidės – labai svarbios medicinai ir veterinarijai. Jos sąlygoja atsparumą įvairiems nuodams, tarp jų antibakteriniams vaistams antibiotikams. Ypač pavojingos yra tos infekcinės bakterijos, kurių plazmidės lemia atsparumą iš karto keletui veiksnių, kaip plazmidė R 100 (žr. 3.46 pav.). Daugelis R plazmidžių yra konjugacinės. Dėl šios priežasties atsparumo antibiotikams ir kitiems vaistams genai labai greitai paplinta bakterijų populiacijose. Atsparumo genai pernešami net kitų genčių bakterijoms. Bakterijos, matyt, noriai dalijasi atsparumo genais, o plazmidžių genomo sandara pritaikyta šiam keitimuisi. Dažnai visi atsparumo toksinams, nepalankiems veiksniams genai sutelkti į bendrą lokusą – **r-determinantą**. Pagal sandarą r-determinantas yra transpozonas.

Didėjantis bakterijų atsparumas dažnai vartojamiems antibiotikams yra atsakas į nesaikingą ir netinkamą antibakterinių vaistų ir sterilinimo priemonių vartojimą.

Plazmidės, kurių genome yra DNR reparacijos genai. Jos irgi didina atsparumą, bet tik genotoksiškiems, sukeliantiems DNR pažaidas

16. 1313

veiksniams – jonizuojantiems ir ultravioletiniams spinduliams, genotoksiškoms cheminėms medžiagoms. Tai operacinių, gimdymo namų rykštė. Tokius genus turi plazmidės R46, R205, pKM101. Antai plazmidėje pKM101 yra genas – homologas bakterijų chromosomos genams *umuDC*. Šie genai padidina atsparumą įvairiems mutageniškiems veiksniams, bet lemia mutagenišką – su klaidomis DNR reparaciją.

Ent plazmidės irgi svarbios medicinoje. Jų genai koduoja enterotoksinų sintezę. Gali sukelti keliautojų diarėją (viduriavimą) ir keletą dizenterijos tipų. Daugelis enterotoksinus koduojančių plazmidžių koduoja ir **pilę**, kuria *E. coli* tvirtinasi prie plonosios žarnos epitelio, todėl ir susergama. Paprastai *E. coli* gyvena storosiose žarnose.

Hly plazmidės koduoja sintezę veiksnių, sukeliančių eritrocitų irimą (hemolizę).

Patogeninių plazmidžių genai koduoja sintezę medžiagų, nuodingų šeimininko organizmui, kurį užkrečia bakterijos, pavyzdžiui, fitopatogeninių bakterijų plazmidės – agrocinų, stafilokokai – stafilocinų ir kt.

Kriptinės plazmidės (gr. *kryptos* – slaptas) iš tikrųjų paslaptingos. Jos nesuteikia bakterijai kokių nors fenotipiškai apčiuopiamų savybių, yra smulkios ir nekonjugacinės. Jų reikšmė kol kas neaiški.

Kai kurių plazmidžių koduojami požymiai turi ūkinės reikšmės. Antai *Pseudomonas* yra plazmidžių su biodegradacijos genais. Ląstelės, kurios turi tokias plazmides, skaido kamparą, tolueną, naftaleną ir kitus organinius junginius. Kai kurios dirvožemio bakterijos gali įsisavinti atmosferos azotą. Tai irgi gali nulemti plazmidės.

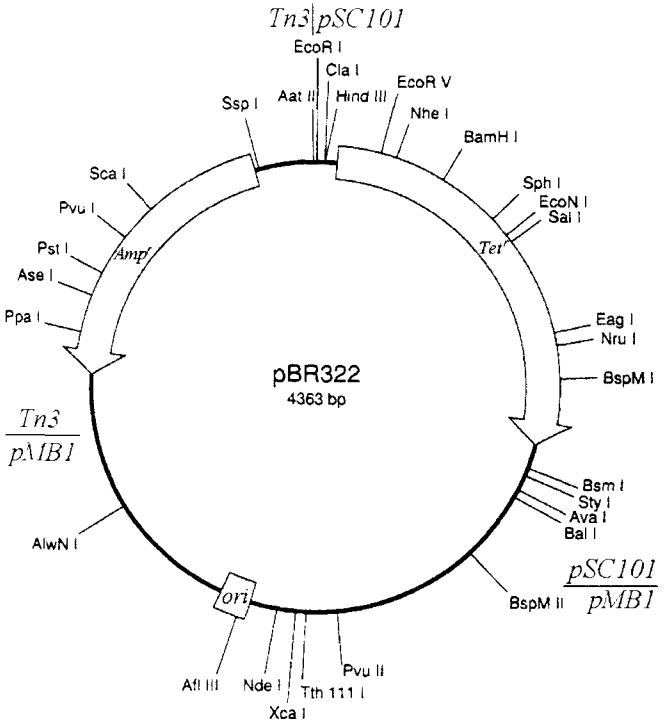
Dirbtinės plazmidės – vektoriai. Tai labai svarbi ir veiksminga plazmidžių panaudojimo sritis.

> **Vektoriai** (lot. *vector* – vežąs, nešąs), arba klonavimo vektoriai, – struktūros, kuriose laikoma įterpta klonuota svetima DNR. Tai atliekama dviem tikslais: saugoti ir dauginti klonuotą DNR.

Vektoriams konstruoti dažniausiai naudojamos plazmidės. Kaip konstruojamos plazmidės – dirbtinės mielių chromosomos (YAC), gana smulkiai buvo nagrinėjama (žr. p. 173). Panašiu būdu konstruojami ir **vektoriai – dirbtinės plazmidės**. Jos būtinai turi *ori*, be kurio plazmidė negalėtų savarankiškai replikuotis. Joje būna žymekliniai genai, pagal kuriuos nustatomos tos ląstelės, kurios įgijo šią dirbtinę plazmidę. Būtinai turi būti nukleotidų sekos, kurias kerpa žinomos restriktazės. Restriktazių kirpimo sekos yra klonavimo vieta. Čia įstatoma svetimoji DNR, kuri turi tokius pat lipnius galus, kaip ir restriktazės perkirpta plazmidė (kerpama ta pačia restriktaze). Kad vektorius būtų talpesnis, iš plazmidės pašalinamos visos nereikalingos sekos.

Taip sukonstruota ir viena „klasiškiausių" dirbtinių *E. coli* plazmidžių – vektorius pBR322. Ši plazmidė tik 4363 bp. Ląstelė, gavusi šią plazmidę, iš karto yra atspari dviem antibiotikams: ampicilinui (amp^R) ir tetraciklinui (tet^R). Tai selektyvūs (tinkami atrankai) žymekliai. Šios plazmidės naudojimo galimybės klonuoti DNR labai didelės, nes pBR322 plazmidė turi labai daug skirtingų restriktazių kirpimo vietų (žr. 3.48 pav.).

Atitinkama restriktaze perkirpta plazmidė tampa linijine su lipniais galais. Susijungus šiems galams, vėl atsistato žiedinė DNR. Prieš



3.48 pav. **Dirbtinė klonavimo plazmidė pBR322**:
ji sukonstruota iš 3-jų dalių: *ori* (replikacijos pradžios seka) iš plazmidės pMB1; *tet* (atsparumo tetraciklinui) genas iš plazmidės pSC101; *amp* (atsparumo ampicilinui) genas iš transpozono Tn3; parodyti unikalūs restrikcijos saitai

tai prie linijinės DNR galo irgi lipniu galu gali prisijungti svetima, klonuojamoji DNR.

Susijungus lipniems galams, žiedinėse rekombinantinėse plazmidėse būna įjungti įvairūs svetimos DNR fragmentai. Pasitaiko ir nerekombinavusių plazmidžių. Atliekama jų atranka. Kai klonuojamoji DNR įterpiama į kurį nors žymeklinį geną, ląstelė tampa jautri vienam iš dviejų antibiotikų. Taip atrenkamos visos rekombinantinės plazmidės, paskui pagal atitinkamų genų veiklos produktus ieškoma plazmidžių, į kurias klonuoti reikiami genai.

Daugiakopijinės plazmidės naudojamos kaip vektoriai konkrečių produktų/medžiagų **superproducentams** sukurti. Kiekviena plazmidė ląstelėje – klonuoto geno kopija. Kuo daugiau plazmidžių, tuo daugiau klonuoto geno kopijų, tuo daugiau bus gaminama pageidaujamo produkto. Netgi specialiai stengiamasi padidinti daugiakopijinių plazmidžių skaičių.

Augalų vėžį sukeliančios Ti ir Ri plazmidės. Šios plazmidės nustebino ir visko mačiusius, prie įvairių netikėtumų pripratusius genetikus. Jos atlieka natūralią genų inžineriją. Be to, genai perkeliami-klonuojami netikėta kryptimi – į dviskilčių augalų genomą.

Augalų vėžį sukeliančios Ti ir Ri plazmidės turi DNR sritį, kuri iš plazmidės perkeliama į augalo ląstelės genomą ir pastarąjį pertvarko. Tai ypatingas genomo pertvarkos būdas.

Šių plazmidžių aptikta *Agrobacterium* gentyje:

- **Ti plazmidė** (angl. *tumor inducing)* iš *Agrobacterium tumefaciens*. Ji turi **T sritį**, kurioje yra genai, inicijuojantys **augalų vėžį** (galus), ir genai, kurie koduoja **neįprastą aminorūgštį** – arginino darinį. Pagal šią aminorūgštį Ti plazmidės skirstomos:

a) **nopalino** – T srityje yra genas *nos*, kuris koduoja **nopaliną** [N^2-(1,3-dikarboksilpropil)-L-argininą],
b) **oktopino** – T srityje yra genas *ocs*, kuris koduoja **oktopiną** [N^2-(D-1-karboksiletil)-L-argininą], ir kt.
Atrandami vis nauji įvairių aminorūgščių (arginino, ornitino, histidino ir kt.) dariniai, kurie vadinami **opinais**.

- **Ri plazmidė** (angl. *root inducing*) iš kitos rūšies – *Agrobacterium rhizogenes*. Dėl Ri plazmidžių augalams išauga „barzdotos" šaknys (šaknų kuokštas) arba ant šaknų atsiranda gàlai. Panašiai kaip ir Ti plazmidė, turi DNR sritį, kuri pereina iš bakterijos plazmidės į augalo genomą. Ši sritis turi kitokius genus ir koduoja kitus opinus.

Abiejų tipų plazmidžių genetika bendrais bruožais yra artima. Už T srities ribų yra 6 genai *vir* (angl. *virulence* – nuodingumas, pyktis, tulžingumas), kurie lemia T srities įterpimą į augalo genomą. Jų veiklą sukelia **fenoliniai junginiai**. Šie junginiai susidaro augalo žaizdose. Tai vadinamieji **žaizdų hormonai.** Tad *Agrobacterium* puola tik pažeistus augalus. Opinai reikalingi pačiai bakterijai.

Ti ir Ri plazmidės – tiesiog gamtos dovana augalų genetikams:

- pati plazmidė įjungia dalį savo genetinės medžiagos, T sritį, į augalo genomą (tai viena sunkiausių aukštesniųjų eukariotų genų inžinerijos problemų);
- genai, kurie lemia T srities įsiterpimą, ir genai, kurie inicijuoja augalų vėžį, yra atskirai. Pašalinus pastaruosius, vėžys nesivysto. Vietoj šių genų T srityje galima įstatyti genų inžinerijai pageidaujamus klonuojamuosius genus/nukleotidų sekas.

Ti ir Ri plazmidžių **T sritis** augalų genų inžinerijai yra unikalus, natūralus vektorius.

3.9.4. Parazitizmas, simbiozė ar natūralūs ląstelės komponentai?

Jau plazmidžių savybės verčia susimąstyti apie jų prigimtį, nes savo ypatybėmis plazmidės labai panašios į nuosaikiuosius virusus – **profagus**.

Simbiozė yra dažnas reiškinys. Kartais ląstelės komponentų simbiozė neabejotina. Antai amebų *Pelomyxa palustris* citoplazmoje randama bakterijų, apie kurias susidaro speciali skiriamoji membrana. *Paramecium* ir kitų infuzorijų ląstelėse pasitaiko dumblių (*Zoochlorella* ir kt.). Kaip ir pridera, dumbliai vykdo fotosintezę ir aprūpina infuzorijas organine medžiaga. Tačiau *Paramecium* be dumblių gali apsieiti, jeigu yra pakankamai bakterijų masės. Netekusios dumblių, *Paramecium* vėl lengvai užkrečiamos (jeigu čia tinka šis žodis) *Chlorella*. Ameba *Pelomyxa palustris* neturi mitochondrijų. Jas atstoja simbiontinės bakterijos. Taigi santykiai su endosimbiontu gali būti labai intymūs. Kaip ir pastaruoju atveju endosimbiontas yra tapęs būtina amebos dalimi, be kurios ši neišgyventų.

Kartais endosimbiontais yra ląstelės organoidai. Antai šliužams maitinantis lapais, į epitelio ląsteles patenka plastidžių, kurios ten egzistuoja gana ilgą laiką.

Genetikų uždavinys – nustatyti, kaip paveldimi įvairūs konkretūs požymiai. Bet kaip vertinti tokią padėtį, kai svarbų organizmui požymį lemia infekcinės dalelės ar endosimbiontai, o ne ląstelės genomas? Taip yra ir su paviršiniais toksinais, kuriuos sintetina ir išskiria į ląstelės paviršių *Paramecium, Saccharomyces, Ustilago.*

Kapa dalelės. 1938 m. Sonebornas (T. M. Sonneborn) aptiko klumpeles (*Paramecium aurelia*), išskiriančias į aplinką kolicinų tipo antibiotiką **parameciną**, kuris užmuša kitas jautrias šiai medžiagai klumpeles. Požymis paveldimas per citoplazmoje esančias daleles, kurios buvo pavadintos kapa dalelėmis. Klumpelių *Paramecium* kamienai, kurie išskiria šiuos antibiotikus, buvo pavadinti kileriais, t. y. **žudikais** (angl. *killer* – žudikas). Kapa dalelės turi DNR. Pasireiškia įvairios jų mutacijos, tačiau jomis galima užkrėsti jautrias paramecinui klumpeles. Kapa dalelės (1974 m.) buvo pripažintos bakterijomis ir pavadintos *Caedobacter taeniospiralis*. Kiek vėliau šiose bakterijose – kapa dalelėse aptikta į virusus panašių dalelių. Jos ir sukelia paramicino sintezę. Žinomi klumpelių kileriniai kamienai, kuriuose kapa dalelių nėra. Juose aptinkama tik į virusus panašių dalelių (galbūt plazmidžių).

Su infekcinėmis struktūromis kapa ir kitas daleles (gama, liambda, sigma) suartina tai, kad jomis galima užkrėsti, bet, pvz., kapa dalelei išgyventi būtina, kad branduolyje būtų *K*, S_1 ar S_2 genai (priklausomai nuo kapa dalelių tipo). Kai mikrobranduolyje šių genų nėra (yra tik recesyvusis *k* alelis), nesvarbu, kokiu būdu ląstelėje atsirastų kapa dalelės, ar užkrėtus, ar dėl ilgalaikės konjugacijos (žr. 3.39 pav.), – šios dalelės išnyks. Tad kapa dalelių išgyvenimą *Paramecium* citoplazmoje lemia branduolio genai.

Kileriniai kamienai išskirti ir iš kitų organizmų grupių – mielių (*Saccharomyces*), kūlių (*Ustilago maydis*). Šis jų požymis persiduoda per panašias į virusus struktūras, turinčias dvigrandę RNR. Šios RNR replikacija vyksta panašiai kaip DNR replikacija.

Endosimbiontai ir lyčių santykio reguliacija. Drozofilos SR. Vienoje iš vaisinės muselės rūšių – *Drosophila willistoni* buvo aptiktos vien patelių linijos ir populiacijos. Vėliau tokia padėtis nustatyta ir kitose drozofilos rūšyse. Kaip ir VCS linijų augalus, tokias drozofilas

apvaisina kitų linijų-populiacijų patinėliai. Taigi gyvybingos patelės yra hibridai, turi pasireikšti heterozė.

Šios drozofilos linijos buvo pavadintos **SR** (angl. *sex ratio*). SR muselių linijose buvo surasti spiralės pavidalo dariniai. Jie žudo tik tas zigotas, kurios turi Y chromosomą, t. y. būsimuosius patinėlius. Šie dariniai, taip specifiškai pažįstantys ląsteles su Y chromosoma, yra spiroplazmos. SR spiroplazmose aptikta panašių į virusus dalelių. Manoma, kad būtent jos nulemia SR savybę sunaikinti zigotas su Y chromosoma. Mat yra linijų su SR savybe, bet be šių SR dalelių.

Manoma, kad aktyvūs SR lokusai, dėl kurių žūva zigotos, turinčios Y chromosomą, genų inžinerijos metodais gali būti iš drozofilos perkelti kitiems gyvūnams. Taip galima sukurti, kur tai reikalinga, vien tik moteriškos lyties linijas.

Nesuderinamumo tipai. Tai dar viena savybė, kurią gali lemti endosimbiontai. Nesikryžminimo barjeras yra labai dažnas reiškinys eukariotų genetikoje. Dažniausiai nesuderinamumą lemia branduolio genai. Bet uodo (*Culex pipiens*) ši savybė paveldima per citoplazmą. Jų citoplazmoje aptikta riketsijų tipo endosimbiontas. Nustatyta bent 17 skirtingų uodo nesuderinamumo tipų, kuriuos lemia skirtingi šios riketsijos tipai.

3.9.5. Nebranduolinio paveldimumo pasireiškimo būdai. Netradicinės genetinės struktūros (prionai, viroidai, supermatricos)

Autonomijos laipsnis. Visais aukščiau išnagrinėtais atvejais nebranduolinis paveldimumas niekuo nesiskyrė nuo branduolinio: jį sąlygojo paveldimumo medžiaga DNR. Kaip ir virusų, genetine medžiaga gali būti ir RNR. Ją turi mielių ir kūlių *Ustilago* kileriniai kamienai.

Šių genetinių struktūrų autonomiją lemia:

- **jų vieta ląstelėje,**
- **gebėjimas savarankiškai sintetinti DNR (arba RNR).**

Pagal šią antrąją savybę yra plačios ribos, bet nė viena iš nagrinėtų struktūrų nėra visiškai savarankiška. Vienos šios struktūros turi ne tik genus, lemiančius DNR replikaciją, bet ir genus, koduojančius transkripciją (įvairių RNR sintezę), pirminio transkripto (preRNR)

brendimą ir transliaciją (baltymo sintezę), taip pat ir konkrečius polipeptidus – fermentus arba jų subvienetus. Tokios yra mitochondrijos ir chloroplastai. Be to, šie organoidai ląstelėje sudaro uždaras erdves – kompartmentus. Juos nuo visos kitos ląstelės dalies riboja membranos.

Tačiau ir šios struktūros nėra visiškai savarankiškos. Dažniausiai jos sudarytos iš baltymų – branduolio genų produktų.

Daugelis kitų genetinių struktūrų, kurios apibūdinamos kaip savarankiškos, iš tikrųjų turi tik replikatorių *ori*, todėl jos tegali inicijuoti savos genetinės medžiagos replikaciją. Jų DNR (arba RNR) replikaciją atlieka branduolio/chromosomų koduojami fermentai.

Branduolinio ir nebranduolinio paveldimumo sąveika ir integracija. Ląstelė – labai darni sistema: nei branduolys be citoplazmos, nei citoplazma be branduolio normaliai veikti negali. Branduolio veiklos produktus panaudoja visos be išimties nebranduolinės genetinės struktūros, kurioms būdinga reduplikacija, t. y. padvigubėjimas. Branduolio genų įtaka nebranduolinėms genetinėms struktūroms pasireiškia labai įvairiai: koduoja sudėtines dalis/polimerus, iš kurių sudarytos nebranduolinės struktūros; lemia struktūrų, kurios neturi atitinkamų genų, genetinės medžiagos replikaciją ir veiklą (transkripciją ir transliaciją); valdo nebranduolinių genetinių struktūrų genų veiklą, kaip *Rf* genai – VCS; nuo jų priklauso nebranduolinių struktūrų, kaip pvz., nuo *S, K* genų – kapa dalelių išgyvenimas.

Tačiau ryšys yra abipusis. Per mitochondrijų produktą ATP ir chloroplastų fotosintezės produktus veikiamos praktiškai visos pagrindinės branduolio funkcijos, genų ir jų grupių veikla (žr. taip pat II, IV ir kt. skyrius).

Genomas visiškai arba iš dalies negali normaliai veikti svetimoje citoplazmoje. Tolimųjų hibridų citoplazmos neatitikimas genome didėja ir gali būti stabilus, todėl šiuo reiškiniu galima paaiškinti kai kuriuos nebranduolinio paveldimumo atvejus, net vyriškąjį citoplazminį sterilumą (pvz., sukryžminus skirtingas nakvišos rūšis). Kad genomas neatitinka citoplazmos, ypač išryškėja suliejant tolimų taksonų somatines ląsteles. Jis pasireiškia vieno iš sulietų **genomų eliminavimu**. Antai suliejus žmogaus ir pelės somatines ląsteles eliminuojasi žmogaus genomas, o žmogaus ir žiurkės, – žiurkės genomas (žr. p. 413).

Reneris (O. Renner) aptiko grupę ypatingų genų, kuriuos pavadino **citoplazmai jautriais genais.**

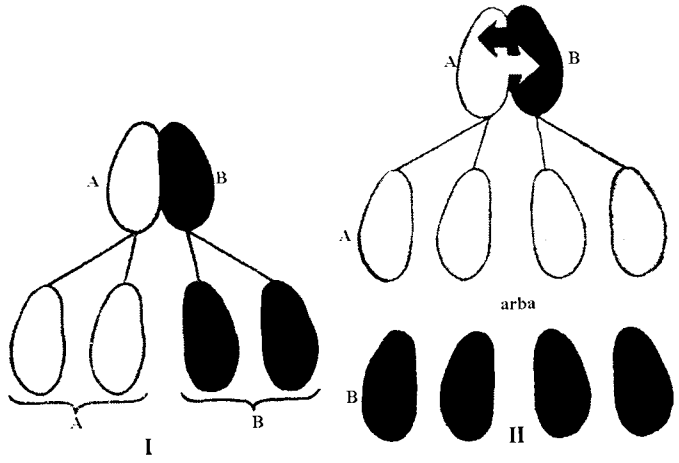
Epigenai. Tai labai savita nebranduolinių genetinių struktūrų grupė. Iš pradžių šias struktūras koduoja branduolio genai, bet išėjusios į citoplazmą jos tampa savarankiškomis genetinėmis struktūromis. Kai kurios jų gali santykinai savarankiškai replikuotis, vadinasi, turi *ori*.

Tokias genetines struktūras pirmasis atrado Sonebornas. Jas pavadino **epigenais** (gr. *epi* – šalia). Taip paveldimi klumpelės (*Paramecium*) poravimosi tipai ir ląstelės paviršinių antigenų serotipai (žr. 3.49 pav.).

Antai pasikeitus sąlygoms, vienus serotipus keičia kiti.

Epigenai gali lemti laikiną nebranduolinį paveldimumą. Neįtikėtina buvo tai, kad epigenais gali būti baltymai. Kilę iš genų, jie gali pasidaryti savarankiški ir veikti kaip dalelės, sukeliančios infekciją. Šie baltymai vadinami **prionais.**

Prionų (baltyminių infekcinių dalelių) atradimas. Prionų atradimo istorija yra ilga ir prasidėjo nesitikint ypatingų sensacijų. Susidomėta žmogaus liga **kuru** ir avių bei ožkų liga, kuri irgi neturi lietuviško pavadinimo ***scrapie*** (skreipi). Gal tiktų pavadinimas „nugrandymas“ (angl. *scrape*). Dėl sutrikusios koordinacijos sergančios avys ar ožkos ramstosi į medžius ar kitus daiktus. Atrodo, lyg jos įnirtingai kasytųsi. Dėl tokio ramstymosi nusigramdo jų vilna.



3.49 pav. ***Paramecium*** **antigenų (serotipo) paveldėjimas:**
I – kai citoplazma neapsikeičiama, tik mikrobranduoliais (trumpalaikė konjugacija); *II* – apsikeičiama ir citoplazma (ilgalaikė konjugacija); *A, B* – serotipai

Atkampioje Naujosios Gvinėjos kalnų vietovėje Fore genties žmonės sirgo nepagydoma liga. Ją vietiniai vadino kuru. Ligoniams laipsniškai sutrikdavo koordinacija – vystėsi ataksija ir sunykdavo centrinė nervų sistema. Liga baigdavosi paralyžiumi ir mirtimi. Mirė daugiausia moterys. Tačiau nustatyta, kad liga yra vienodai paveldima iš motinos ir tėvo pusės. Manyta, kad tai pavyzdys genų, kurių veiklą riboja lytis. Moterų šioje gentyje suserga iki 50%, o vyrų tik 10% (įskaitant mažamečius berniukus). Vyrai tokiu atveju yra geno platintojai.

Gentyje susidarė nenormali padėtis pagal lyčių santykį. Vyrai stengėsi migruoti į kitus rajonus. Bet kilo pavojus, kad ten jie toliau platins šį itin pavojingą geną. Australijos valdžia, kuriai priklausė ši salos dalis, uždraudė Fore genties žmonėms migruoti ir stengėsi vyrus sugrąžinti į genties užimamą teritoriją. Tai papiktino net genetikus. Antai vienas žymiausių gyvulių genetikos specialistų Hatas (F. B. Hutt) knygoje „Gyvulių genetika“ (136 psl. 1969 m., orig. 1964 m.) rašė: „Įdomu, ar būtų imamasi tokių eugenikos priemonių, jeigu (o tai visiškai tikėtina) ši mutacija atsirastų Sidnėjuje ar San Franciske?“

Tačiau laukė nemaloni staigmena. Genties morale teko nusivilti. Liga užsikrečiama neįtikėčiausiu būdu. Genčiai būdingas ritualinis kanibalizmas (tai buvo itin slepiama). Moterys ir vaikai ragaudavo mirusiojo kūno. Taip buvo ir užsikrečiama. Genų veiklos ypatybės čia niekuo dėtos.

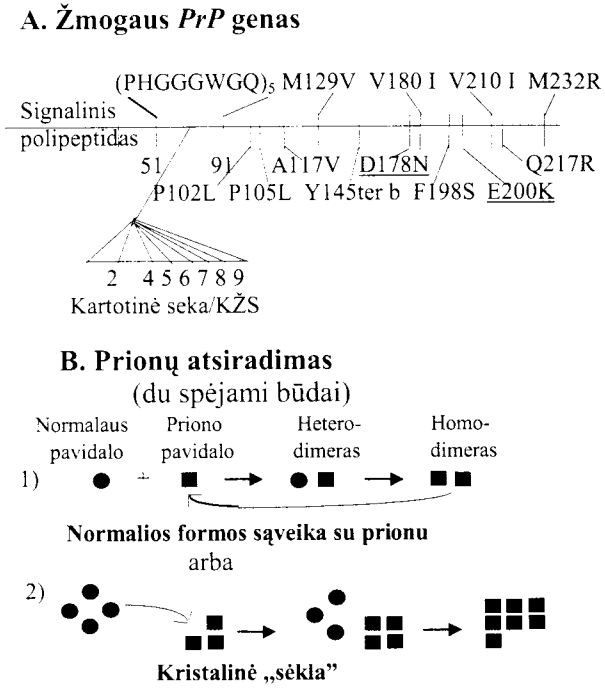
Kuru buvo vėl susidomėta, kai buvo įsitikinta, kad labai panašūs yra Kreitzfeldo-Žakobo (Creutzfeldt-Jakob), Gerstmano-Štreislerio-Šeinkerio (Gerstmann-Streussler-Scheinker) sindromų požymiai. Neseniai atrasta dar viena prioninė liga – mirtina šeiminė insomnija (paveldima nemiga). Kanibalizmu šiomis ligomis susirgusių žmonių negalima įtarti. Pamatuotai manoma, kad ja galima užsikrėsti suvalgius sergančių gyvulių mėsos.

Iš esmės tie patys smegenų pokyčiai būdingi ir galvijų spongiforminei encefalopatijai, ir jau minėtai avių bei ožkų ligai *scrapie*. Sergantys gyvuliai tapo bandymų objektais visoms spongiforminėms encefalopatijoms tirti (kuru, Kreitzfeldo-Žakobo sindromai irgi tarp jų). Štai kodėl Anglijoje naikinami susirgę galvijai ir vengiama pirkti šios šalies mėsos produktų. Stebina ir iš gilios senovės atėjusi išmintis ir patirtis – nerašyta taisyklė, savotiškas „tabu“ – nevalgyti kritusių gyvulių mėsos.

Nustatyti du itin svarbūs dalykai:

- **užkratas yra baltymas (o ne DNR ar RNR struktūros);**
- **galima užsikrėsti valgant mėsą.**

Užkrėstos buvo beždžionės, žiurkėnai, pelės. Pastarieji du gyvuliukai naudojami prionų tyrimams.



3.50 pav. ***PrP* genas ir prionų atsiradimas:**
A – kartotinė seka lemia Kreitzfeldo-Žakobo sindromą. Sergančiojo genome, įvykus šio segmento delecijai, į pradinę padėtį negrįžtama; *B-1* – dėl sąveikos normali forma virsta prionu, šis disocijuoja, kad kitas normalias formas paverstų prionais. *B-2* – normalios formos, atsidūrusios šalia prionų, virsta prionais. Kaskart prionų sankaupa didėja. Vis daugiau normalių formų virsta prionais. Sankaupa auga kaip kristalas (remiantis S. B. Prusiner, 1998; R. B. Wickner et al., 1995)

***PrP* genas ir prionų atsiradimas**. Nustatytas pradinis genas, dėl kurio atsiranda spongiformines encefalopatijas sukeliantys prionai. Šis genas *PrP* (angl. *prion proteine*) koduoja paviršinį ląstelės baltymą glikoproteiną (apie 28 kDa). Prionas – mutantinė šio baltymo forma. Pavyko šio geno mutacijas susieti su minėtais žmogaus sindromais (3.50 pav., *A*). Visų aukščiau minėtų ligų priežastis yra alelinės to paties *PrP* geno mutacijos. Antai kartotinės sekos, koduojančios 8 aminorūgštis, mutacija yra Kreitzfeldo-Žakobo ligos priežastis. Kiekvieną žmogaus ligą lemia **mutacijos įvairiose *PrP* geno vietose**. Mutantiniai baltymai virsta prionais – savarankiškomis infekcinėmis dalelėmis.

Trys prionų ypatybės yra labai svarbios:

- prionai **atsparūs proteazėms,** o normalius, nemutantinius PrP baltymus proteazės skaido;
- didžiausią pavojų kelia tai, kad prionų negalima **sunaikinti** įprastomis **sterilizacijos priemonėmis,** pvz., ultravioletiniais spinduliais, kuriems itin jautrios nukleorūgštis turinčios infekcinės dalelės, virusai. Dėl šios priežasties prionai gali išlikti ant chirurginių įrankių, natūraliuose žmogaus augimo hormono preparatuose – vaistuose.
- mutantiniai *PrP* geno koduojami baltymai **paverčia normalius** *PrP* baltymus **prionais.**

Prionų paveldėjimas. Infekcijos būdu patekęs arba iš mutantinio PrP baltymo kol kas nevisiškai aiškiu būdu juo tapęs (3.50 pav., *B*; yra tik hipotezės) prionas sukelia lyg grandininę reakciją:

(1) prionas + normalus baltymas → 2 prionai,
(2) 2 prionai + 2 normalūs baltymai → 4 prionai,
(3) ir t. t.

Tai įrodyta eksperimentais. Sumaišius normalius PrP baltymus su prionais, normalūs baltymai virsdavo prionais.

Pirminiams prionams atsirasti vien mutacijos *PrP* gene neužtenka. Klonavus *PrP* geną bakterijoms, prionai nesusidarydavo. Prionams atsirasti reikalingi kažkas tas, kas nenustatyta ir ką turi eukariotų ląstelės. Mat du prionai URE3 ir PSI surasti mielėse. Jie kilę iš kitų genų. Pirmasis yra kilęs iš normalaus geno *URE2*, kuris koduoja baltymą, skaidantį ureidsukcinatą. Ši medžiaga susidaro vykstant uracilo sintezei. Antrasis (PSI) kilęs iš geno *SUP35*, koduojančio baltymą, skatinantį transliacijos (polipeptido sintezės) pabaigą.

Prioninės ligos ir alelinių genų sąveika. Gali būti, kad prionai kur kas dažnesni negu manyta. Šiuo metu susidomėta visomis ligomis, kurios vystosi laipsniškai, progresuoja. Tarp potencialių žmogaus ligų, kurių progresavimas gali būti siejamas su prionais, yra Alheimerio ir Parkinsono ligos, šoninė amiotrofinė sklerozė (pažeidžiamos nugaros ir pailgosios smegenys), miozitas (raumenų uždegimas).

Genetikus domina visos tos ląstelės struktūros, kurios dauginasi **reduplikacijos būdu,** t. y. sugeba pačios padvigubėti. Šią sąlygą puikiai atitinka ir centriolės.

Centriolės. Labai mįslinga ląstelės struktūra. Ji būdinga tik gyvūnų ląstelėms. Užima centrinę padėtį **centrosomose**, nuo kurių ląstelei

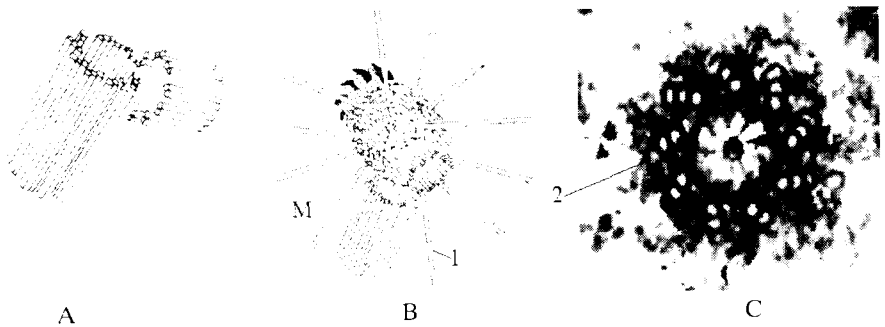
dalijantis nutįsta įvairių tipų mikrovamzdeliai. Todėl manoma, kad centriolės reikalingos ląstelei dalytis, tačiau augalų ir grybų ląstelės centriolės neturi, o ląstelės normaliai pasidalija. Dėl to kartais abejojama centriolių svarba ląstelėms dalytis.

Centriolės sugeba padvigubėti, nors sudarytos labai paprastai – iš mikrovamzdelių. Devynis kartus po 3 mikrovamzdelius (3.51 pav., *A* ir *C*). Be to, centriolių padvigubėjimas susijęs su ląstelių pasidalijimu. Jos dalijasi prieš branduolio dalijimosi pradžią. Ši centriolių savybė labai įdomi. Centriolė padvigubėja savotiškai. Šalia senosios centriolės statmenai jai susidaro nauja centriolė (3.51 pav., *B*).

Dukterinės ląstelės paveldi po vieną centrosomą su dviem viena kitai statmenomis centriolėmis. Iki profazės pradžios centrosoma būna šalia branduolio. Ten ji ir pasidalija į dvi: centriolės atsiskiria viena nuo kitos, šalia jų statmenai susidaro po naują dukterinę centriolę. Padvigubėjusios centrosomos juda į priešingus galus, inicijuoja mitozės mikrovamzdelių susidarymą.

Kai ląstelės pasidalija, dukterinėms ląstelėms tenka po vieną centrosomą su dviem statmenai viena kitai cenriolėmis. Ir vėl viskas kartojasi iš naujo.

Centriolės yra puikus pavyzdys, kaip iš genų produktų baltymų gali savarankiškai susidaryti sudėtingos struktūros, be to, sugebančios reduplikuotis.



3.51 pav. **Centriolės ir jų reprodukcija:**
A – centriolės S stadijoje, šalia stambesnės motininės centriolės yra smulkesnė dukterinė centriolė; *B* – centriolės metafazėje, iš motininės (subrendusios) centriolės į įvairias puses išsidėstę mikrovamzdeliai (1); *C* – dumblio *Nitella* centriolės bazalinės dalies skerspjūvis, matyti mikrovamzdelių, iš kurių sudarytos centriolės, triados (2) (*C* - iš F. R. Turner, 1968)

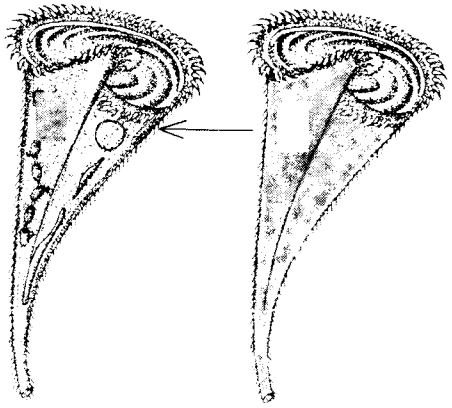
Stebina ir tai, kad sudėtinga struktūra susidaro iš palyginti paprastų sudėtinių dalių – dviejų baltymų tubulinų α ir β granulių. Dar vienas tubulinas (γ) ir baltymas pericentrinas yra centrioles supančioje vadinamojoje pericentrinėje medžiagoje. Ji irgi yra centrosomos sandaros dalis. Toliau mikrovamzdeliai susidaro beveik automatiškai, kaitaliojantis α ir β tubulinų granulėms. Tik neaišku, kas jungia mikrovamzdelius į pluoštelius po 3, po to į jų kompleksą (9×3).

Genetinės medžiagos (DNR ar RNR) centriolėse aptikti nepavyko.

„Lopytos infuzorijos". Tai dar vienas reiškinys, kuris siejamas su prionais. Pirmuonių ląstelės išorėje yra **žievė** (korteksas). Jis įgyja laikiną genetinį savarankiškumą, nors neturi nei DNR, nei replikacinės RNR. Pirmasis tai nustatė Sonebornas, bet apie 30 metų reiškinys buvo pamirštas.

Klumpelei (*Paramecium*) buvo pašalintas žievės gabalas ir plyšys užlopytas žievės gabalėliu iš kitos klumpelės, kurios žievė turėjo kitokį piešinį. Lopas ne tik prigijo, bet ir buvo paveldimas nelytinėse kartose. Dar įspūdingesni buvo bandymai, atlikti su kita infuzorija – trimitėliu (*Stentor*), kurio žievės piešinys dar ryškiau skiriasi (schematiškai šie bandymai pavaizduoti 3.52 pav.).

Skirtingai nuo prionų ir net centriolių, infuzorijų žievė yra ne vieno, o daugelio genų produktas. Vadinasi, savarankiškumą įgyja erdvinis baltymų išsidėstymas. Šiuo atžvilgiu domina ir membranos, nes naujos membranos susidaro šalia senųjų. Membranos lemia funkcinę-erdvinę ląstelės sandarą, iš jų sudaryta daugelis ląstelės organoidų.



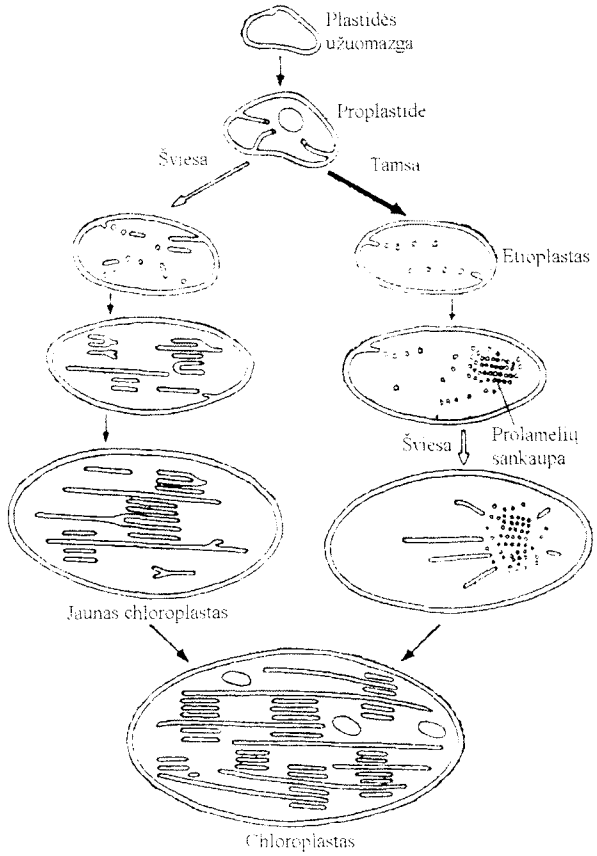
3.52 pav. **Trimitėlio (*Stentor*) kortekso transplantacija** (schematinis pavaizdavimas)

Kaip minėta, supermatricos, membraninės struktūros (įvairių tipų endoplazminis tinklas, Goldžio tinklinis kompleksas, plastidės, mitochondrijos ir kt.) gaminasi iš senų motininių struktūrų, vykstant jų reduplikacijai. Net tos ląstelės struktūros (chloroplastai, mitochrondrijos), kurios turi genetinę medžiagą, nepradeda nuo nieko. Augalų chloroplastų sandara sėklos gemale yra kitokia, negu funkcionalaus

chloroplasto lapo ląstelėse, – sudaro **proplastides**. Tai smulkios (apie 1 mm) įvairios formos struktūros, atribotos nuo kitos ląstelės dalies dviem membranomis. Bet tai **chloroplasto pradmuo**.

O toliau ankstyvose raidos stadijose pradeda formuotis sudėtinga vidinė chloroplasto sandara (3.53 pav.). Įdomu tai, kad susiformavę aukštesniųjų augalų chloroplastai nesugeba dalytis. Tik žemesniųjų augalų (samanų) jie dalijasi. Aukštesniųjų augalų dalijasi tik proplastidės, bet iš naujo chloroplastai neatsiranda.

Panašiai ir mitochondrijos, kurios dauginasi pasidalydamos pusiau arba pumpuravimosi būdu. Pastaruoju atveju „pumpurėlio" – promitochondrijos vidinė sandara stipriai skiriasi nuo subrendusios mitochondrijos sandaros, bet tai yra **mitochondrijos pradmuo**.



3.53 pav. **Chloroplasto raida iš plastidės užuomazgos ir proplastidės**

Vadinasi, besidalijančios ląstelės struktūros išsaugo, perduoda naujoms, dukterinėms struktūroms savo bazinę, pradinę sandarą. Toks genetinės informacijos perteikimo būdas vadinamas **supermatriciniu.**

Ląstelė – savarankiškiausia supermatrica.

Ji irgi turi savo bazinę sandarą, kuri toliau rutuliojosi įvairiomis kryptimis, bet Virchovo (R. Virchow) 1858 m. tezės

kiekviena ląstelė iš ląstelės

nenuneigė niekas, nors bandymų būta (pvz., liūdnai pagarsėjusi O. Lepešinskaja).

Kerpės – ypatinga simbiozės forma. Nepriklausomai nuo to, ar botanikai laikys jas atskiru tipu, ar tik klase, – šie organizmai paveldimumo atžvilgiu itin įdomūs. Tai dumblio ir grybo simbiozės produktas. Susidaro organizmai su stabiliomis visiškai naujomis savybėmis, kurių neturi nei grybas, nei dumblis. Net biocheminė jų sudėtis skiriasi nuo abiejų sudedamųjų dalių: jie sugeba sintetinti visiškai naujas medžiagas (jų priskaičiuojama iki 300), kurių negamina nei grybas, nei dumblis, pvz., sintetina kerpių rūgštis, kurios slopina bakterijas, todėl naudojamos antibiotikams gaminti.

Šių simbiontų sandara yra pastovi, savita, nebūdinga kitiems organizmams. Pastovumo įrodymas yra kerpių sistematika. Skiriama per 400 genčių ir apie 26000 rūšių (manoma, kad jų gali būti gerokai daugiau – iki 40000). Tačiau kol kas kerpės genetiškai neištirtos. Mat jos labai lėtai auga, be to, eksperimentiškai nepavyksta gauti kerpės iš simbiozės komponentų – dumblių ir grybų. Matyt, šie organizmai dar atskleis daug nauja.

Viena šiandien neabejotina ir akivaizdu, kad visuma šiuo atveju nelygi ją sudarančių komponentų sumai. Sistema įgyja **naujas** savybes, kurių neturėjo ją sudarančios dalys.

Kaip toli siekia biologijoje (genetikoje) šios tezės, kol kas nėra kaip kiekybiškai įvertinti, pvz., sužinoti, kokia informacija slypi **ląstelėje kaip visumoje**.

3.10. Genomo tyrimo metodai

3.10.1. Genomo tyrimo metodai ir chromosomų genolapiai

Tarp genetikų populiariame žurnale „Trends in Genetics“ 1997 m. buvo diskutuojama, ar reikia mokyti studentus „skaičiuoti iki trijų“.

Turėta omenyje Morgano bendradarbio Startevanto 1915 m. sukurtą metodą genų vietai chromosomoje nustatyti genetiniu metodu pagal krosingoverio dažnį tarp 3 genų. Kai kurių diskusijoje pasisakiusių nuomone, šiuo metu niekas tokiu metodu genų vietos chromosomoje nenustatinėja, nes yra labai veiksmingų metodų, todėl kam „skaičiuoti iki trijų“?

Ar iš tikrųjų nereikia mokytis „skaičiuoti iki trijų“? Būtina. Daugelio klasikinių genetinių metodų pamatą sudaro genetiniai reiškiniai, be to, patys bendriausi, būdingi daugeliui ar net visiems organizmams. Antai minėtu Startevanto metodu matuojamas krosingoverio dažnis ir nustatoma genų sankiba. Tiek vienas, tiek kitas reiškinys būdingas visiems gyviems padarams – nuo virusų iki žmogaus.

Visi genai, esantys **vienoje chromosomoje,** paveldimi kartu **sukibę,** t. y. sudaro vieną **sankibos grupę.**

Jeigu genas pakeičia savo vietą, t. y.

- iš vienos vietos chromosomoje pernešamas (translokuojamas) į kitą,
- ar iš vienos nehomologinės chromosomos perkeliamas į kitą nehomologinę chromosomą,
- ar apsikeičiama fragmentais tarp homologinių chromosomų – vyksta krosingoveris,

visais atvejais **pakinta sukibusių genų seka.**

Krosingoverio dažnio nustatymas – paprasčiausias ir prieinamiausias būdas aukštesniųjų eukariotų genetinei rekombinacijai kiekybiškai įvertinti apsikeičiant segmentais tarp homologinių chromosomų.

Panašus į krosingoverį keitimasis segmentais vyksta visose organizmų grupėse, tarp jų ir virusų (žr. VIII sk.). Visi šie reiškiniai smulkiau nagrinėjami B ir C dalyse.

Linijinių genetinių struktūrų genolapis vaizduojamas linija. Joje pateikiama papildomų svarbių žinių apie chromosomos sandarą: centromeros vieta, telomeriniai galai, sąsmaukos, chromosomų mutacijos. Visa chromosoma suskirstoma segmentais ir numeruojama. Taip lengviau nurodyti geno, chromosomų mutacijų, kartotinių sekų sankaupų ir kt. vietą chromosomoje.

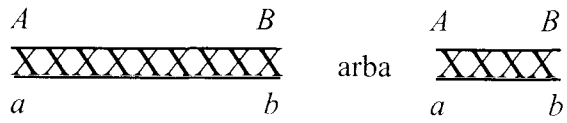
Žiedinių DNR molekulių genolapis yra žiedinis. Jame pateikiamos žinios apie replikacijos pradžią (*ori*), judriuosius genomo elementus, o genetinių struktūrų, kurios įsiterpia į chromosomą ar pernešamos iš vienos ląstelės į kitą, nurodomos ir atitinkamos sekos:

17. 1313

att, tra ir pan. Su kelių tokių genetinių struktūrų – mitochondrijų, plazmidžių genolapiais jau buvo progos susipažinti.

Chromosomų genolapiai – tai grafiškai pavaizduota chromosomos genetinė sandara – genai, jų sekos ir atstumai.

Drozofilos genetiniai genolapiai. Morganui pirmajam kilo mintis, kad krosingoverio dažnis yra tiesiog proporcingas atstumui tarp genų. Tiriant krosingoverį tarp genų *A(a)* ir *B(b)*, fiksuojama bet kokia kaita tarp šių genų, nesvarbu kurioje chromosomos vietoje tai būtų įvykę. Kuo didesnis atstumas tarp genų *A(a)* ir *B(b)*, tuo didesnė krosingoverio tikimybė:

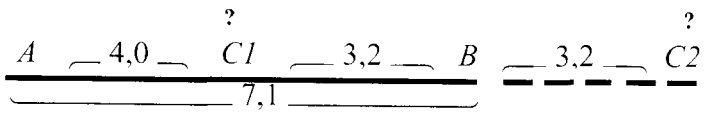


Čia X galimos keitimosi vietos, chiazmai tarp homologinių chromosomų.

Iš pradžių nustatoma **sankibos grupė**. Visi sukibę genai yra toje pačioje chromosomoje. Pavyzdžiui, jeigu išaiškinama, kad drozofilos genas *Bar* paveldimas, sukibęs su genu *carnation*, tai šie genai yra toje pačioje chromosomoje. Norint konkrečiai nustatyti, kurioje iš 4 drozofilos chromosomų yra genas, kiekvienoje jų turi būti bent po 2–3 genetinius žymeklius. Paprastai tai dominuojantys genai, kurių paveldėjimą nesunku nustatyti.

Tarkime, kad pirmą chromosomą žymi genas *A*, antrą – *B*, trečią – *C*, ketvirtą – *D*. Jeigu tiriamasis genas *E* sukibęs su *A*, tai jis yra pirmojoje (t. y. X) chromosomoje.

Geno vieta chromosomoje ir atstumas nuo kitų genų nustatomi nuosekliai ištyrus krosingoverio dažnį tarp trijų genų. Pavyzdžiui, jeigu krosingoverio dažnis tarp genų *A* ir *B* yra 7,1%, galima teigti, kad atstumas tarp šių genų lygus 7,1%. Tarkime, kad krosingoverio dažnis tarp genų *B* ir *C* yra 3,2%. Suprantama, kad genas *C* yra arčiau geno *B* negu genas *A*, bet geno *C* padėtis yra neaiški: jis gali būti per 3,2% į dešinę arba į kairę nuo taško *B*:



Geno *C* padėčiai *A* ir *B* atžvilgiu patikslinti tiriamas krosingoverio dažnis tarp A ir *C*. Jeigu jis lygus 4,0%, tai genas C yra tarp *A* ir *B*, nes

$$4{,}0\% + 3{,}2\% \approx 7{,}1\%$$

Galutinė genų seka ***ACB,*** ir visada atstumai tarp genų krosingoverio vienetais sumuojami:

$$A\text{–}B + B\text{–}C + C\text{–}D + D\text{–}E...$$

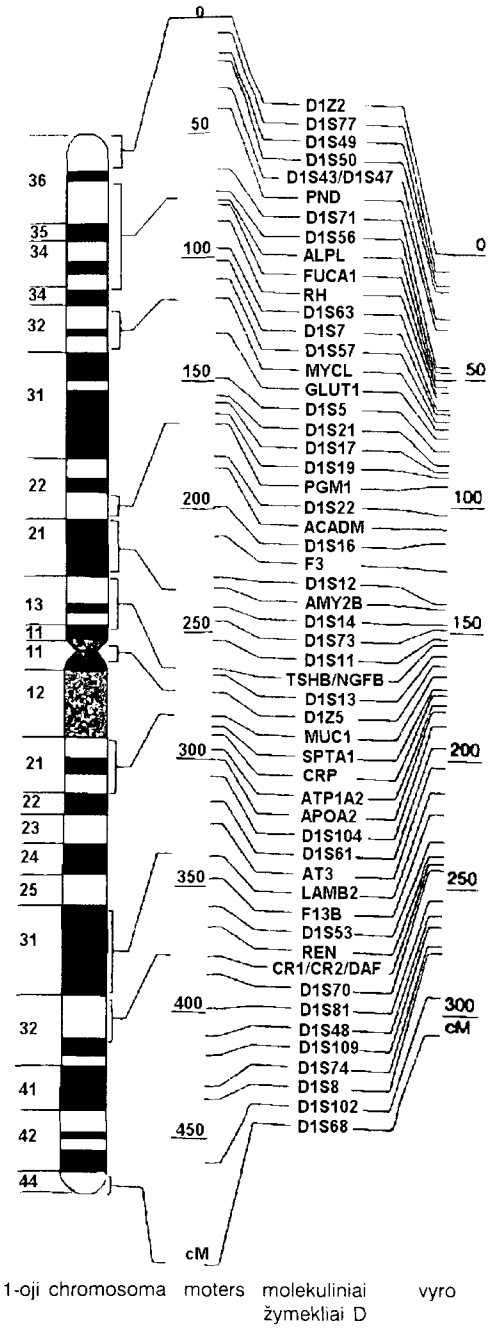
Taip sumuojant galima gauti iki kelių šimtų procentų – priklausomai nuo chromosomos ilgio. Antai III drozofilos chromosomos ilgis 106,2%, ir tiesiogiai nustatyti atstumą tarp labiausiai nutolusių šioje chromosomoje genų *Minute* (smulkūs, trumpesni šereliai) ir *roughoid* (šiurkštokos, nelygiu paviršiumi akys) negalima.

Rekombinacijos dažnis 0,01 (skaičiuojant nuo visumos – 1,00), arba 1% (skaičiuojant nuo 100%) vadinamas **centimorgana.** Žymima cM Morgano garbei.

Maksimalus atstumas tarp tiriamų genų neturi būti didesnis kaip 25% (krosingoverio dažnis ne didesnis kaip 50%), nes didesnis atrodytų, lyg genai būtų nesukibę – skirtingose, nehomologinėse chromosomose.

Krosingoveris tiriamas tarp gana artimų, nenutolusių genų. Bendras jo procentas beveik atitinka atskiros chromosomos ilgį. Ilgiausių drozofilos II ir III chromosomų ilgis krosingoverio vienetais atitinkamai yra 107,0 ir 106,2%, tuo tarpu mažytėje IV chromosomoje visi genai susitelkę vienoje vietoje ne vien dėl to, kad ši chromosoma maža, bet ir todėl, kad joje krosingoveris nevyksta (jai būdinga vadinamoji **achiazminė mejozė**.

Įvairių organizmų rekombinacija gali vykti skirtingai, tai ir jų genolapiai sudaromi įvairiais būdais, priklausančiais nuo rekombinacijos būdo. Antai bakterijų chromosomos genolapis sudaromas pagal laiką, per kurį įvairūs genai pereina konjugaciniu tilteliu (žr. 8.2 pav.) iš vienos ląstelės į kitą. Nustatant genų vietą šiuo metodu, atstumas tarp genų matuojamas laiko vienetais – minutėmis ir sekundėmis (žr. p. 541). Be to, bakterijų yra keli rekombinacijos būdai: transformacijos, transdukcijos, seksdukcijos. Ir šiais, skirtingais būdais sudaromi genolapiai. Drozofilos genolapiai irgi buvo sudaryti skirtingais būdais.



3.54 pav. **Žmogaus 1-osios chromosomos genetinis ir fizinis genolapiai:**
Kairėje: 1-oji chromosoma – diferencinis dažymas, dešinėje – šonuose genetiniai, viduryje – fizinis genolapiai, cM – centimorganos; dėl nevienodo krosingoverio dažnio moters (dažnesnis) – vyro (retesnis) genetinių genolapių atstumai skirtingi

Citologiniai genolapiai. Reikėjo sudaryti drozofilos genolapius kitais būdais, ne tik pagal krosingoverio dažnį. Mat jo dažnis priklauso nuo įvairių genomo sandaros ypatybių (centromeros, chromosomų mutacijų), fiziologinių-genetinių (rekombinacijos genų mutacijų, senėjimo, lyties) ir aplinkos (metalų jonų kiekio, temperatūros) veiksnių. Drozofilos patinėliuose krosingoveris apskritai nevyksta. Žmogaus, kaip ir pelių, daugelyje chromosomos segmentų (bet ne visuose!) krosingoverio dažnis moteriškoje lytyje yra didesnis negu vyriškoje. Rekombinacija žmogaus ovocituose vyksta beveik dvigubai dažniau negu spermatocituose. Todėl moterų chromosomų genolapiai, sudaryti krosingoverio metodu, yra apie 40% ilgesni, atstumai tarp genų didesni (3.54 pav.). Antai

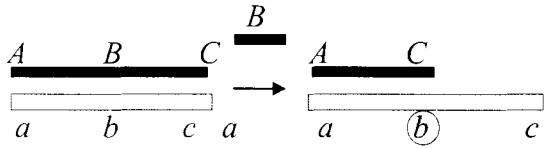
ABO kraujo grupių genas yra sukibęs su nagų-girnelės sindromo genu. Moterų kariotipe atstumas tarp šių lokusų nustatomas 14 cM, vyrų kariotipe – tik 8 cM.

Labai palankiai buvo įvertintas rusų kilmės genetiko Dobžanskio (Th. Dobzhansky), dirbusio tuo metu Morgano laboratorijoje, 1928 m. surastas būdas sudaryti citologinius chromosomų genolapius. Pritaikytos chromosomų mutacijos – translokacijos. Buvo tiriamos drozofilos, kurių kariotipe chromosomos segmentas iš vienos chromosomos buvo perkeltas (translokuotas) į kitą nehomologinę chromosomą. Dėl translokacijų susidaro naujos sankibos grupės, kurios nustatomos tiriant genų sankibą analizuojančiaisiais kryžminimais (heterozigota kryžminama su recesyviąja homozigotine linija, žr. p. 592). Analizuojančiaisiais kryžminimais tiriamas ir krosingoverio dažnis.

Citologiškai aptinkamas translokuotas segmentas, išmatuojamas jo ilgis. Iš genų sankibos analizės aiškūs ir genai, kurie buvo perkelti su šiuo segmentu. Šiuo metu translokacijos ir vertinamos dėl atsiradusių naujų sukibusių genų derinių, kaupiamos jų kolekcijos (žr. p. 433).

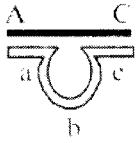
Delecijų metodas. Chromosomoms kartografuoti dažniau naudojamas kitas chromosomų mutacijų tipas – delecijos. Be to, Bridžesas (C. B. Bridges) ir Painteris (T. S. Painter) chromosomų mutacijoms aptikti pasinaudojo drozofilos politeninėmis chromosomomis, kuriose lengvai aptinkamos ir labai mažos delecijos.

Kaip jau ne kartą minėta, delecijos aptinkamos genetiniais ir citogenetiniais metodais. Jas, kaip ir kitas chromosomų mutacijas, galima sukelti jonizuojančiais spinduliais. Apšvitinami hibridai, kurių vienoje homologinėje chromosomoje yra dominuojantys, o kitoje – recesyvieji genai. Normaliai fenotipe turėtų pasireikšti dominuojantysis genas. Tačiau, kai įvyksta delecija segmento, kuriame yra dominuojantysis genas, recesyvusis genas nėra stelbiamas ir pasireiškia (yra hemizigotinėje būklėje). Žemiau pavaizduotu atveju hemizigotinėje būklėje yra *b* genas:



Todėl ir ieškoma individų su recesyviaisiais požymiais. Jie tiriami toliau – jų mejozė, chromosomų konjugacija.

Jeigu recesyvusis genas pasireiškė tikrai dėl delecijos, – mejozės zigotenoje-pachitenoje, kai homologinės chromosomos konjugavusios, nepakitusioje chromosomoje matoma kilpa:



Pagal fenotipą nustatomas genas, o pagal kilpą – šio geno vieta chromosomoje.

Drozofilos homologinės chromosomos konjuguoja ir somatinėse ląstelėse. Tai būdinga ir seilių liaukų ląstelėms, kuriose yra labai stambios politeninės chromosomos. Jose matyti ir labai nedideli chromosomų sandaros pokyčiai.

Palyginus genetinių ir citologinių chromosomų genolapius, paaiškėjo, kad genų seka, nustatoma skirtingais metodais, sutampa. Skiriasi tik atstumai tarp genų.

3.10.2. Žmogaus chromosomų kartografavimas. Restrikciniai genolapiai

Žmogaus genų katalogai. Diplomatiniais sumetimais žmogaus kartografuotų genų skaičius dažnai nenurodomas, nes visada yra pavojus nurodyti netikslius duomenis: šis skaičius sparčiai keičiasi, didėja tiesiog dienomis. Vadovaujamasi amerikiečio Makjusiko (V. A. McKusick) leidžiamais genų katalogais (1994 m. buvo jau 11-oji laida). Šiame kataloge registruojamos ir paveldimosios žmogaus ligos.

1995 m. apie 3400 genų buvo kartografuoti autosomose (nelytinėse chromosomose), X chromosomoje apie 285 ir Y chromosomos nepseudoautosominėje dalyje (holandrinių) – 23. Genų sankibos analizės metodais buvo nustatyta apie 20% genų, chromosomų mutacijų tyrimais – tik apie 5% genų vieta, bet į šį skaičių įeina tokie svarbūs genai kaip *Rb*, p^{33}, kurie yra antionkogenai, ir jų mutacijos lemia vėžį.

Apie pusę visų žmogaus genų kartografuota somatinių ląstelių hibridizacijos metodu.

Somatinių ląstelių hibridizacijos metodas. Somatinės ląstelės suliejamos apardžius arba visiškai suardžius ląstelės apvalkalėlį Sendėjaus viruso galvučių preparatu, fermentais ar polietilenglikoliu (žr. p. 412). Tačiau suliejus tolimų organizmų ląsteles, vieno iš genomų chromosomos eliminuojasi. Tai vyksta tam tikra kryptimi, kurios priežastis dar reikėtų ištirti. Suliejus

žmogaus ir **pelės** ląsteles, eliminuojasi **žmogaus** chromosomos,

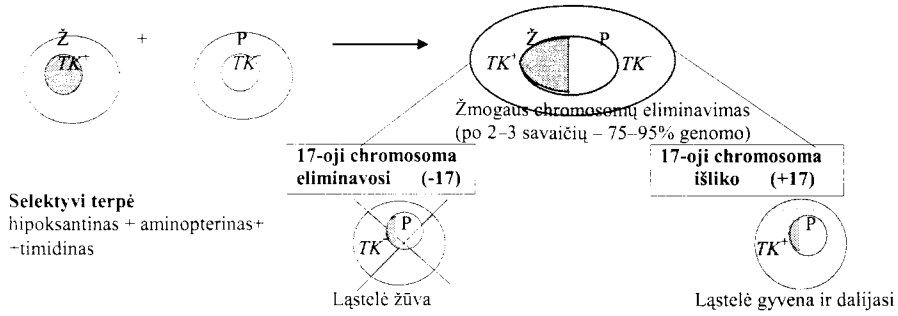
žmogaus ir **žiurkės** ląsteles, eliminuojasi **žiurkės** chromosomos.

Šia savybe naudojamasi nustatant chromosomą, kurioje yra genas. Be to, chromosomų eliminacijos kryptį galima valdyti: to organizmo, kurio chromosomų eliminaciją norima sukelti, somatinės ląstelės apšvitinamos jonizuojančiais arba ultravioletiniais spinduliais. Tada, pvz., apšvitinus pelės ląsteles, eliminuojasi ne žmogaus, o pelės chromosomos.

Tyrimams lengviau pasirinkti reikiamų genotipų eksperimentinius gyvuliukus, todėl kaupiamos ir saugomos jų genetinės kolekcijos.

Pirmasis žmogaus genas, kurio sankibos grupė buvo nustatyta tokiu būdu, buvo **timidinkinazės**. Pelių linija (TK^-) nesintetino šio fermento. TK^- ląsteles lengva atskirti nuo TK^+ ląstelių, kurios sintetina timidinkinazę. Pelių, kurių genotipas buvo TK^-, ląstelės neaugo selektyvioje (atranką atliekančioje) terpėje, kurioje buvo trijų medžiagų – hipoksantino, aminopterino ir timidino mišinys (vadinamoji HAT terpė). Visos TK^- ląstelės tokioje terpėje žūdavo.

Suliejus žmogaus somatines TK^+ ląsteles su pelės TK^- ląstelėmis, kaip paprastai, vyko žmogaus chromosomų eliminacija, tačiau kai kurios pelių ląstelių kultūros augo selektyvioje HAT terpėje:



Pasirodo, pavienės žmogaus chromosomos gali išlikti. Gaunami vadinamieji **asimetriniai hibridai.**

Taigi po chromosomų eliminacijos susidarė ląstelių klonai – asimetriniai hibridai, ir HAT terpėje gyvos liko tik tos ląstelės, kurios turėjo 17-ąją žmogaus chromosomą. Vadinasi, TK^+ genas yra 17-ojoje chromosomoje.

Lygiai taip pat buvo sulietos somatinės žmogaus ląstelės, galinčios sintetinti gliukozo-6-fosfatdehidrogenazę ($G6PD^+$) su pelės $G6PD^-$ ląstelėmis. Šiuo bandymu pasitikrinta, ar tuo metodu teisingai nustatoma genų sankiba. Mat iš anksto buvo žinoma, kad $G6PD^+$ genas yra žmogaus X chromosomoje taigi $G6PD^-$ yra „sukibęs" su lytimi. Vyrai, kurių ląstelėse sintetinama mažai G6PD, serga liga, vadinama fabizmu. Ligos pavadinimas rodo, kad tokie žmonės gali apsinuodyti nesunokusiomis pupomis (*Vicia faba*). Jiems pavojinga net vaikščioti po žydinčių pupų lauką, taip pat gali pakenkti kai kurie vaistai: sulfamidiniai preparatai, barbitūratai. Nesintetinantiems fermento žmonėms visi šie veiksniai sukelia mažakraujystę.

Suliejus žmogaus $G6PD^+$ ir pelės *G6PD* ląsteles, gliukozo-6-fosfatdehidrogenazės sintezė vyko tik tose ląstelių asimetrinių hibridų kultūrose, kuriose buvo išlikusi žmogaus X chromosoma.

FISH. Molekulinės DNR hibridizacijos ant citologinių preparatų metodas. Reikia dar kartą priminti šį DNR–DNR arba DNR–RNR hibridizacijos metodą. Pakėlus temperatūrą, DNR „lydosi"– atsiskiria viena nuo kitos DNR grandinės, ir jos gali jungtis su homologinės DNR komplementariomis grandinėmis-sekomis arba su RNR. Ši komplementariai jungiasi su ta grandine ir tik su ta vieta, nuo kurios ši RNR buvo sintetinta, t. y. kur yra šios RNR genas.

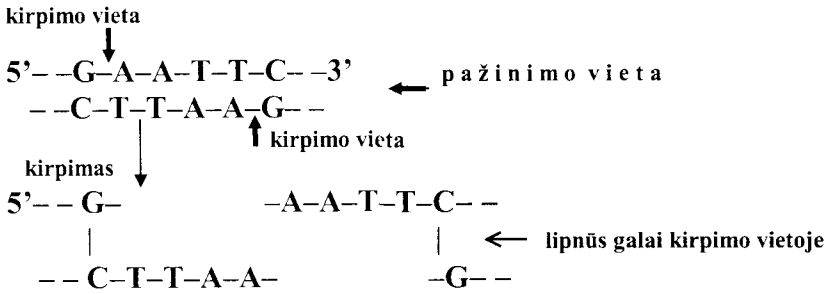
Sujungus DNR–RNR ant citologinių chromosomų preparatų ***in situ*** (buvimo vietoje), galima nustatyti ne tik **chromosomą,** bet ir **chromosomos vietą,** kur yra tiriamasis genas.

Šiuo metodu genai nustatyti 1972 m. Hibridizacijai *in situ* naudota žymėtoji radioaktyviuoju izotopu hemoglobino mRNR. Deja, išskyrus tai, kad ši mRNR jungėsi su dviem chromosomomis, visa kita (t. y. kokios iš tikrųjų yra chromosomos) buvo neteisingai nustatyta.

Vis dėlto tai buvo pamatas atsirasti įvairiems DNR hibridizacijos ant citologinių preparatų metodams, kuriais naudojamasi įvairiais tikslais, dažniausiai geno vietai, sandarai, alelinėms mutacijoms nustatyti. Naudojami **molekuliniai zondai**, bet jie aptinkami ne žymint radioizotopais, o fluorescenciniais dažais, todėl metodas buvo pavadintas FISH (angl. *fluorescence in situ hybridization*). (Besidomintiems giliau: įvairios šio metodo variacijos dėstomos J. Lazutkos „Molekulinėje citogenetikoje", 1998).

Dar kartą restriktazės. Prisiminkime YAC mielių dirbtinių chromosomų konstravimą (žr. p. 173). Ten restriktazės naudotos klonuojamajam DNR segmentui įterpti ir žiedinę DNR paversti linijine struktūra. Restriktazių pažinimo vietos yra kiekviename natūraliame arba dirbtiniame (pvz., minėtoje plazmidėje pBR 322, žr. 3.48 pav.) vektoriuje.

Naudojamasi šių endonukleazių savybe specifiškai pažinti ir kirpti DNR trumputėse palindrominėse sekose. Pvz., dažnai vartojama restriktazė iš *E. coli* – EcoRI kerpa DNR taip:



Nors restriktazės yra specifiniai bakterijų fermentai, bet jie vienodai pažįsta ir kerpa tas pačias bet kurio organizmo DNR sekas. Tuo ir naudojamasi klonuojant DNR segmentus, gaunant rekombinacines DNR.

DNR karpymas restriktazėmis pravertė ir kitiems tikslams:

- sudarant restrikcinius genolapius ir panaudojant restrikcijos vietas kaip molekulinius žymeklius;
- tiriant populiacijų ir genų polimorfizmą;
- nustatant genetinę asmens tapatybę vadinamuoju pirštų atspaudų metodu: tai svarbu teismo medicinoje;
- nustatant asmenis su mutantiniais genais, sąlygojančiais paveldimas ligas. Tai svarbu medicininei-genetinei konsultacijai ir prenatalinei diagnostikai.

Restrikciniai genolapiai. Šiuo atveju pavadinimas neatitinka esmės, nes chromosomose linijiškai kartografuojami ne genai, o restriktazių pažinimo vietos. DNR skaidoma įvairiomis restriktazėmis. Pagrindinis uždavinys surikiuoti teisinga seka fragmentus, nustatomus elektroforeziškai. Tai atliekama įvairiais būdais. Dažniausiai pirmiausia

DNR suskaidoma į stambius segmentus dviem skirtingomis restriktazėmis, paskui gautieji segmentai dar kartą sukarpomi, sukeičiant restriktazes. Pagal tai, kaip sukarpyti tokiu būdu segmentai uždengia vienas kitą, nustatoma jų išsidėstymo seka.

Molekuliniai žymekliai fiziniuose chromosomų genolapiuose žymimi D raide (žr. 3.54 pav.). Restriktazės pažinimo vietoje gali įvykti mutacija, ir toje vietoje restriktazė DNR nekerpa, todėl gaunamos dvi alternatyvos. Įsitikinta, kad **molekuliniai žymekliai** irgi **paveldimi pagal Mendelio dėsnius**. Šia jų savybe ir naudojamasi mutantiniam žmogaus genui susekti.

3.10.3 Genomo bibliotekos. DNR sekvenavimas

Genomo bibliotekos – klonuotų genomo fragmentų rinkinys, atstovaujantis visam genomui.

DNR fragmentai klonuojami į fagų, plazmidžių arba YAC (mielių dirbtinių chromosomų) vektorius. Fagų vektorius paprasčiau saugoti užšaldytus, bet dėl daugelio priežasčių, kurių viena – didesnis talpis, žinduolių genomo bibliotekose pirmenybė teikiama YAC.

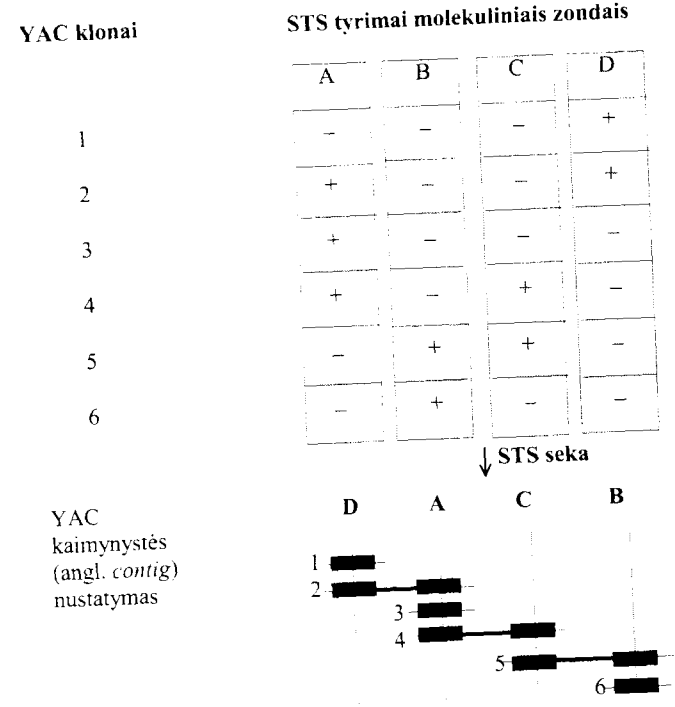
Bibliotekos dydis priklauso nuo genomo dydžio:
E. coli genomas sutelpa apie 1500 klonuotų fragmentų,
mielių – apie 4600 fragmentų,
drozofilos – apie 50000 fragmentų,
žmogaus – apie 500–800 tūkstančių fragmentų.

Bibliotekos yra dviejų tipų:

- **genomo arba chromosomų**; jose saugomi tiesiogiai klonuoti chromosomos fragmentai,
- **kDNR (arba cDNR)** – saugomos DNR kopijos, gautos sintetinant DNR nuo mRNR (naudojant atvirkštinę transkriptazę). Tai konkrečiose ląstelėse arba audiniuose veikiančių (ekspresuojamų) genų bibliotekos.

Kaip ir kiekvienoje bibliotekoje, genomo bibliotekoje turi būti tvarka, kad reikiamu momentu galima būtų pasinaudoti reikalingu DNR klonu. Ši tvarka nustatoma sudarant **STS** (angl. *sequence tagget site*) **genolapius**. Tai dar vienas atvejis, kaip ir restrikcinių genolapių, kur terminas genolapis neatspindi esmės, nes kartografuojami ne genai, o klonuoti fragmentai. Veikiama panašiai, kaip ir sudarant restrikcijos pažinimo vietų genolapius. Klonų seka nustatoma pagal tai, kurie klonai dengia vienas kitą (yra sanklotiniai, 3.55 pav.).

STS seka nustatoma trumpais (apie 500 bp) žinomos sekos DNR segmentais. Tai atliekama **Sauterno blotingo metodu**. Ši metodą 1975 m. pasiūlė Sauternas (E. M. Southern). Sauterno blotingas (angl. *blot* – dėmė, sutepti (ypač rašalu), nudžiovinti sugeriamuoju popieriumi). Pastaroji prasmė, matyt, labiausiai atitinka esmę, nes restriktazėmis suskaidyti vienagrandžiai DNR fragmentai po elektroforezės talpinami ant nitroceliuliozės arba ant nailono filtro. Ten jie surišami pagal jų santykinę padėtį. Fragmentai pažįstami radioaktyviuoju arba kitokiu būdu žymėtuoju zondu, su kuriuo jie komplementariai jungiasi.



3.55 pav. **STS genolapio sudarymas**:
6-ių YAC klonų išdėstymas genomo bibliotekoje

Sukurti panašūs metodai **RNR ir polipeptidams pažinti**. Linkę pajuokauti tyrinėtojai metodą RNR aptikti pavadino **Norterno blotingu** (angl. *northern* – šiaurinis, šiaurės, po *Southern*, išvertus pavardę, reikštų pietinis, pietų). Atitinkamai „įsisiūbavus", imunocheminis metodas polipeptidams aptikti pavadintas **Vesterno blotingu** (angl. *western* – vakarietiškas, vakarų). Pastaruoju metodu polipeptidas aptinkamas labai mažais kiekiais, gali būti – net iš pavienės ląstelės.

DNR sekvenavimas. Nukleotidų sekai nustatyti DNR karpoma restriktazėmis, ir nukleotidų seka nustatoma 100–200 nukleotidų ilgio vienagrandžiuose fragmentuose. Sekvenuojant antrąją DNR grandinę, patikrinama, ar pirmoji grandinė yra sekvenuota teisingai.

Šiuo metu yra trys pagrindiniai DNR **sekvenavimo metodai:**

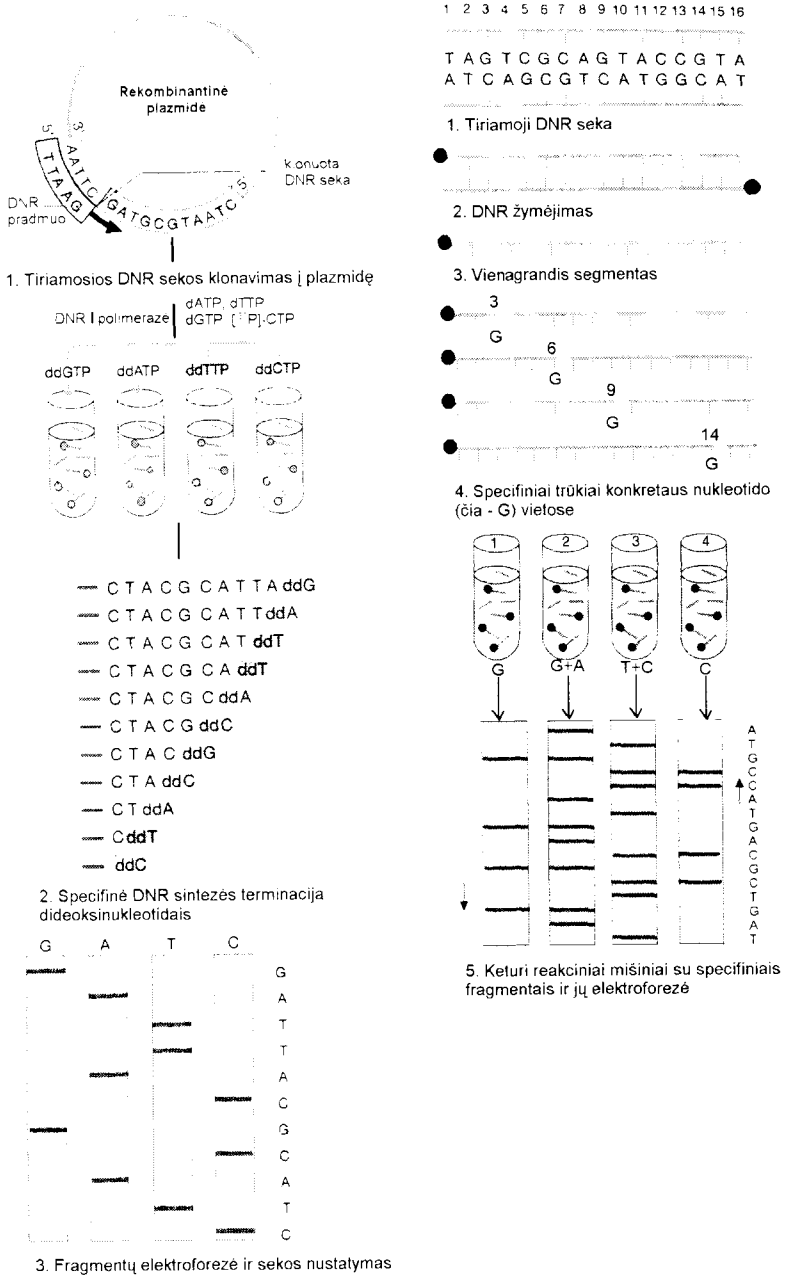
- Maksamo-Gilberto cheminis metodas,
- Sengerio fermentinis, arba dideoksi, metodas,
- automatinis metodas.

Amerikiečių Maksamo (A. Maxam) ir Gilberto (W. Gilbert) metodu DNR fragmentas specifiškai kiekvienam nukleotidui suskaidomas cheminiu būdu. Suskaidytų fragmentų galai fiksuojami (γ-P^{32}) ATP, kurį prijungia minėtasis fermentas polinukleotidkinazė. Keturiais būdais suskaidyti fragmentai frakcionuojami elektroforeziškai. Kiekvienu būdu – atskirai. Žymėtieji fragmentai radioautografuojami ir skaitomi (3.56 pav., dešinė).

Sengerio metodas. Anglų mokslininko Sengerio (F. Sanger) metodas yra populiaresnis, juo dažniau naudojamasi. Sekvenuojamasis DNR fragmentas suskaidomas į mažesnius fragmentus. Prie klonuotų vienagrandžių segmentų 3′ galo prijungiamas pradmuo, žymėtas radioaktyviuoju izotopu arba fluorochromu, pvz.:

3′– AACA – GATGTAATC–5′
5′– TTGT –
žymėtasis pradmuo

Į reakcijos mišinį dedama:
+DNR I polimerazė,
+dATP, dCTP, dTTP, dGTP,
+nedideliais kiekiais (1:4 palyginti su dNTP) **po vieną kurį** iš keturių dideoksinukleozidtrifosfatų: ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP.



3.56 pav. **Dviejų DNR sekvenavimo būdų palyginimas:** kairėje – fermentinis, dešinėje – Maksamo-Gilberto

Iš viso paruošiami 4 reakcijų mišiniai, kurių kiekviename yra po skirtingą ddNTP.

DNR I polimerazė prijungia nukleozidtrifosfatus, bet retkarčiais pasitaikantis atitinkamas ddNTP irgi prijungiamas. Ten, kur jis prijungiamas, tolesnė antrosios DNR grandinės sintezė nutrūksta. Susidaro įvairaus ilgio fragmentų mišinys, kuris tiriamas elektroforeziškai. Kiekvieno reakcijos mišinio (su ddGTP, arba ddATP, arba ddTTP, arba ddCTP) – atskirai. Po to nuo radioautogramos arba fluorogramos tereikia nuskaityti nukleotidų seką (3.65 pav., kairė).

Automatiniai DNR sekvenatoriai yra juos gaminančių firmų paslaptis. Bazės žymimos fluorochromu (-ais), kiekviena bazė turi savas spalvas. Pvz., žymint A – žalia, T – raudona, C – mėlyna, G – juoda. Automatinis analizatorius užrašo spalvų sugėrimo maksimumus (viršūnes), o atitinkama kompiuterinė įranga analizuoja ir užrašo nukleotidų seką.

Pastaruoju metu DNR sekvenavimas, kaip minėta, tobulėja: pvz., elektroforeziškai tiriami dideli DNR fragmentai, o tai labai paspartino totalinį žmogaus genomo sekvenavimą.

IV. GENŲ VEIKLOS VALDYMAS. GENŲ GRUPĖS

4.1. Operonas. *Lac* operonas

Palyginus įvairias eukariotų somatines ląsteles, buvo akivaizdu, kad jose yra veiklūs skirtingi genai. Eukariotų ląstelės yra specializuotos, diferencijuotos. Dažnai tai susiję su vieno baltymo sinteze. Pavyzdžiui, raumens ląstelėse sintetinasi miozinas, kuris lemia pagrindinę šių ląstelių funkciją susitraukti, o eritrocituose yra hemoglobinas, dėl to šios ląstelės perneša O_2 ir CO_2. Raumens ląstelėse nėra hemoglobino, o eritrocituose – miozino, nors kamieninės jų ląstelės turi genetinę informaciją šiems baltymams sintetinti. Eksperimentiškai pavyko iš ląstelių, kurios taptų raumens ląstelėmis, išauginti eritrocitus, ir atvirkščiai. Kamieninėse raumens ląstelėse yra veiklūs vieni genai, o kamieninėse eritrocitų ląstelėse – kiti. Tačiau genų veiklos valdymas pradėtas tirti nuo bakterijų. Eukariotų genų veikla valdoma labai sudėtingai. Šių tyrimų pradininkai buvo prancūzų mokslininkai Žakobas (F. Jacob) ir Mono (J. Monod).

Pradžia didelio pasisekimo nežadėjo. Mono susidomėjo *Escherichia coli* prisitaikymu (adaptacija) perdirbti laktozę, įvairius galaktozidus. Paaiškėjo, kad fermentų, kurie skaido laktozę į galaktozę ir gliukozę, sintezė vyksta ne visą laiką, o tik tada, kai yra induktorius. Juo gali būti laktozė arba kai kurie kiti galaktozidai.

Svarbiausia, kad ir fermentų yra ne vienas. Iš pradžių buvo žinomi du:

β-galaktozidazė ir **β-galaktozidpermeazė.**

Vėliau šią baltymų grupę papildė dar vienas fermentas β-galaktozidtransacetilazė, bet tai operonui atrasti reikšmės neturėjo.

Kiekvieną baltymą koduoja genas, o kiekvieno geno galima gauti mutacijas, kurios visiškai slopintų geno veiklą. Tokių mutacijų paieškomis ir užsiėmė Žakobas. Jis gavo ne tik mutacijas, kurios slopina, pvz., β-galaktozidazės arba β-galaktozidpermeazės sintezę, bet ir mutantus, kuriuose vienu kartu nuslopinta abiejų fermentų sintezė. Genetikas pasakytų, kad tai dvigubas mutantas, t. y. mutacija įvyko abiejuose genuose: koduojančiame ir β-galaktozidazę, ir β-galaktozidpermeazę.

Tačiau sudomino neįprastas reiškinys. *E. coli* vieno geno mutacija vyksta 10^{-7} dažniu, taigi dvigubo mutanto tikimybė turėtų būti lygi pavienių genų mutavimo tikimybių sandaugai:

$$10^{-7} \cdot 10^{-7} = 10^{-14}.$$

Tuo tarpu šios „dvigubos" mutacijos, kurias gavo Žakobas, irgi atsirasdavo 10^{-7} dažniu lyg būtų vieno geno mutacija.

Laimė, Žakobas buvo iš tų mokslininkų, kurie tyrė F plazmidę ir išaiškino bakterijų poravimosi tipų F^+, F^-, Hfr prigimtį. Be to, jis surado būdą, kaip nustatyti *E. coli* genų vietą chromosomoje. Šį metodą Žakobas ir pritaikė gautų laktozės metabolizmo mutantų vietai nustatyti. Paaiškėjo, kad

- genai, kurie lemia konkrečių baltymų sintezę, buvo vienas šalia kito;
- šalia jų buvo dar vienas, atskiras genas (tiksliau, nukleotidų seka, kurią netiktų vadinti genu, bet tai paaiškėjo vėliau), kurio mutacija nutraukdavo abiejų fermentus koduojančių genų veiklą;
- aptiktas dar vienas genas, kurio mutacija irgi nutraukdavo abiejų fermentų sintezę. Šis genas buvo nutolęs per didelį atstumą nuo kitų genų.

Apibendrinę tyrimų rezultatus, Žakobas ir Mono pateikė schemą (žr. toliau), kaip valdoma laktozės metabolizmo genų veikla.

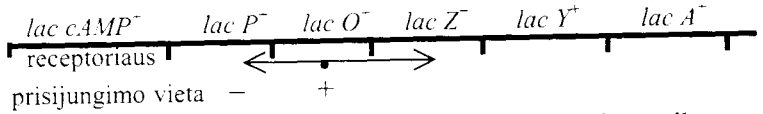
Operonas. Genų kompleksą, sudarytą iš vadinamųjų struktūrinių genų ir šalia esančių nukleotidų sekų, kurios valdo struktūrinių genų veiklą, Žakobas ir Mono pavadino **operonu**. Pirmoji šalia struktūrinių genų esanti nukleotidų seka buvo pavadinta **operatoriumi**. Vėliau šią valdančiąją operono dalį papildė

- **promotorius** – nukleotidų seka, kurią, kaip žinia, pažįsta transkripcijos pradžios baltymai ir RNR polimerazė;
- **cAMP** (ciklinio adenozinmonofosfato) **receptoriaus** prisijungimo seka.

Šiuo metu manoma, kad visos nukleotidų sekos, prie kurių jungiasi valdymo genų produktai ir kurios skirtos operono veiklai valdyti, jungiamos į bendrą promotoriaus dalį. Taigi ir operatorius, ir cAMP

receptoriaus jungimosi vieta yra operono promotoriaus dalys. Šis patikslinimas labai svarbus, nes yra operonų, kurie turi po du tris promotorius, pvz., rRNR genų sankaupa.

***Lac* operonas ir jo veiklos valdymas**. *Lac* operonas tapo klasikiniu, standartiniu. Su juo lyginama kitų operonų veikla. Kaip minėta, jo sudėtyje yra 3 struktūriniai genai: $lacZ^+$ (β-galaktozidazės), $lacY^+$ (β-galaktozidpermeazės) ir $lacA^+$ (β-galaktozidtransacetilazės). Prieš juos yra valdančioji operono dalis: *O* (operatorius), *P* (promotorius) ir *cAMP receptoriaus* jungimosi vieta (išsidėstę „prieš srovę"):



Transkripcija (mRNR sintezė) *lac* operone vyksta tik nuo struktūrinių genų ir dalies operatoriaus. Vadinamoji lyderinė seka reikalinga ir transliacijai, o kartais ir pačiai transkripcijai valdyti.

> Nuo operono transkribuojama viena bendra mRNR. Ji yra trumpalaikė. Nutrūkus transkripcijai, senosios mRNR suyra, o naujų nesusidaro – fermentų sintezė nutrūksta.

Tai priklauso nuo dviejų veiksnių: **induktoriaus** ir **geno-reguliatoriaus *lac I***, kuris koduoja baltymą **represorių (R)**. Šis baltymas atpažįsta operatoriaus nukleotidų seką, ir jeigu terpėje nėra galaktozidų, kurie galėtų sukelti fermentų sintezės indukciją, represorius prisijungia prie operatoriaus. Tai tampa neįveikiama kliūtimi RNR polimerazei, ir mRNR sintezė nutrūksta.

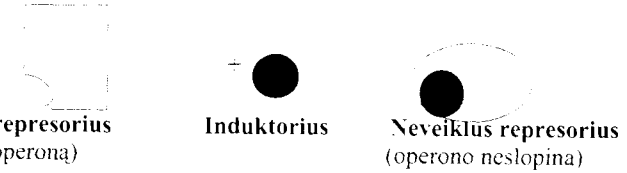
Induktorius sąveikauja su represoriumi. Induktoriumi gali būti ne visi galaktozidai, o tik tie, kurie keičia represoriaus erdvinę sandarą, ir šis negali sąveikauti su operatoriumi. Transkripcija toliau neslopinama, ir gaminasi mRNR. Kartais galaktozidas gali būti substratas (perdirbamas), bet nesukelia operono veiklos, ir atvirkščiai.

Lac represorius yra tetrameras, todėl yra ir kitokių jo sąveikos su induktoriumi modelių. Žemiau pavaizduotas, autoriaus nuomone, yra suprantamiausias – esmė nuo to nenukenčia: sąveikaudamas su induktoriumi, represorius taip pakeičia savo erdvinę struktūrą, kad negali sąveikauti su operatoriumi.

Represorius turi du aktyvius centrus:

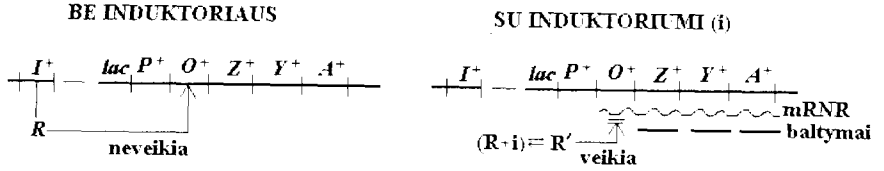
- vienu pažįsta operatoriaus seką ir su ja jungiasi,
- kitu jungiasi su induktoriumi.

Dėl to keičiasi erdvinė represoriaus sandara:



$i + R \Leftrightarrow R'$

Šiuo atveju represorius negali sąveikauti su operatoriumi, todėl atstoja nuo jo. RNR polimerazei kliūčių nebėra, vyksta mRNR sintezė:



Tai dar ne viskas. Iš tikrųjų *lac* operono valdymas yra dvigubas.

Kai aplinkoje yra ir laktozės, ir gliukozės, *E. coli* elgiasi „protingai“: kam eikvoti energiją ir skaidyti laktozę, jeigu yra gliukozės; nors yra induktorius, operonas neveikia.

Genai supresoriai ir genai aktyvatoriai. Genas, kuris koduoja cAMP (ciklinio adenozinmonofosfato) receptorių, gali būti priskiriamas prie aktyvatorių. Mat be cAMP receptoriaus RNR polimerazė negali prisijungti prie *lac* promotoriaus. Šis baltymas pats turi būti aktyvinamas cAMP, kuris sudaro kompleksą su šiuo receptoriumi. Gliukozės vaidmuo čia netiesioginis. Ji valdo cAMP sintezę – ją slopina, todėl **nesusidaro cAMP → receptorius neaktyvinamas → jis nesusijungia su DNR → RNR polimerazė neaktyvinama → operonas neveikia.**

Tik kai nėra gliukozės, įvykiai pakrypsta kita linkme. Tada jau svarbu, ar yra induktorius; kitaip tariant, ar yra ką skaidyti, t. y. ar yra galaktozidų.

Suderintas kelių operonų valdymas. Ciklinis adenozinmonofosfatas (cAMP) panašiai valdo ne tik *lac* operoną, bet ir daug kitų operonų, kurių paskirtis koduoti baltymus, skaidančius įvairias medžiagas, pirmiausia cukrus (galaktozę, laktozę, arabinozę, maltozę).

Toks suderintas didelio skaičiaus genų valdymas ypač būdingas eukariotams. Vien tik drozofilos baltymas Polycomb valdo apie 150 (!) genų.

Genai operone išsidėstę neatsitiktinai, ir tai svarbu jų veiklai.

Operono poliškumas. Pirma, nukleotidų sekos valdančiojoje operono dalyje yra išsidėsčiusios tam tikra tvarka: cAMP receptoriaus jungimosi vieta – RNR polimerazės jungimosi vieta – operatorius. Antra, visos šios sekos atlieka savo paskirtį tik būdamos cis-padėtyje, šalia struktūrinių genų:

$$lac\ cAMP\text{-}j.sr.^{+}\ P^{+}\ O^{+}\ Z^{+}\ Y^{+}\ A^{+}$$

Tai nustatyta bakterijų dalinėse ir laikinose heterozigotose – **merozigotose**, kurias galima sukurti genetinės rekombinacijos metodais.

Merozigotoje $\dfrac{lac\ P^{+}\ O^{+}\ Z^{-}\ Y^{-}\ A^{-}}{lac\ P^{+}\ O^{-}\ Z^{+}\ Y^{+}\ A^{+}}$

operonas neveiklus, nors ir yra visų genų dominuojantys aleliai. Šis faktas vėliau padėjo genų veiklą valdančius veiksnius skirstyti į cis ir trans veikiančius (žr. toliau).

Struktūrinių genų seka operone irgi neatsitiktinė. Tuo įsitikinta pirmiausia tiriant įvairias mutacijas. Kaip jau minėta, *P* ir *O* mutacijos gali pakeisti visų operono genų veiklą, bet ir vienų struktūrinių genų mutacijos gali veikti kitus struktūrinius genus – pastebimas poliškumas: mutacija $lacZ^{-}$ sumažina genų $lacY^{+}$ ir $lacA^{+}$ aktyvumą, tuo tarpu geno $lacY^{+}$ mutacija genui $lacZ^{+}$ įtakos nebeturi, tik silpnina geno $lacA^{+}$ veiklą. Vadinasi, vieni genai veikia kitus operone viena kryptimi, tolstant nuo operatoriaus, t. y. poliškai:

$$\xrightarrow{\qquad} lacP^{+}O^{+}Z^{+}Y^{+}A^{+}.$$

(a) $\xrightarrow{\qquad} lacP^{+}O^{-}Z^{+}Y^{+}A^{+}$ – operonas neveikia,

(b) $\xrightarrow{\qquad} lacP^{+}O^{+}Z^{-}Y^{+}A^{+}$ – neveikia $lacZ^{-}$, susilpnėjusi $lacY^{+}$ ir $lacA^{+}$ veikla,

(c) $\xrightarrow{\qquad} lacP^{+}O^{+}Z^{+}Y^{-}A^{+}$ – neveikia $lacY^{-}$, susilpnėjusi $lacA^{+}$ veikla,

(d) $lacP^{+}O^{+}Z^{+}Y^{+}A^{-}$ – neveiklus tik $lacA^{-}$ genas.

Ir normalių šių genų alelių aktyvumas operone nevienodas: veikliausias yra genas prie pat operatoriaus, neveikliausias – esantis toliausiai nuo operatoriaus. Tai **kiekybinis geno veiklos valdymo būdas**: ląstelėje ne visų baltymų molekulių reikia vienodai. Operone svarbiausias

baltymas yra β-galaktozidazė, todėl šį fermentą lemiantis genas yra arčiausiai operatoriaus; jis ir aktyviausias. Taigi β-galaktozidazės molekulių sintetinama daugiausia.

Operatoriaus ir geno-reguliatoriaus mutacijų ypatybės. Kaip minėta, operono tyrimai pradėti nuo *nul*-mutacijų, dėl kurių operono veikla visiškai nutrūksta. Čia reikia išnagrinėti kitaip pasireiškiančias mutacijas – kai *lac* operono veikla tampa pastovi. Žakobas ir Mono nenutrūkstamą operono veiklą pavadino **konstitutyvia** (pastovia). Tai svarbus atradimas. Jis rodo, kad genų skirstymas į konstitutyvius ir adaptacinius nėra nekintamas. **Adaptaciniai ir audinių specifiniai** genai dėl mutacijos gali virsti nuolat veikiančiais – **konstitutyviais**. Konstitutyvios gali būti tiek operatoriaus, tiek geno-reguliatoriaus mutacijos.

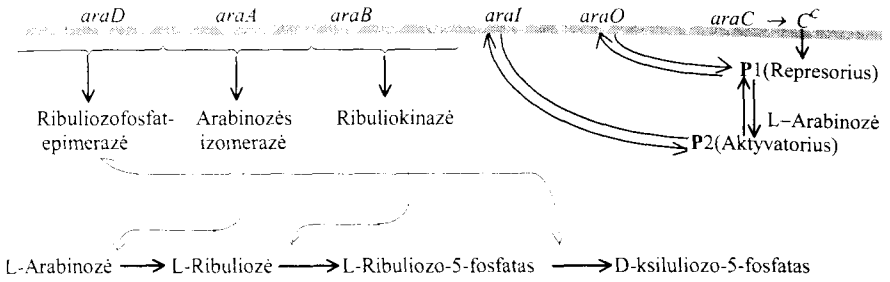
Operonų įvairovė. Operonai labai įvairūs savo sandaros ir valdymo ypatybėmis.

Sandaros atžvilgiu:

- gali turėti ne vieną promotorių (kaip minėta, rRNR genų sankaupa – *rrn* operonas; žr. ir toliau); kiekvienas jų dažniausiai valdo skirtingą operono veiklos režimą, pvz., konstitutyvų ar indukuotą (arba intensyvesnį – silpnesnį);
- promotoriuje yra įvairus skaičius nukleotidų sekų, su kuriomis sąveikauja valdymo genų produktai;
- transkribuojamojoje dalyje gali būti valdymo sekos; dėl jų keičiasi viso operono veikla; toks yra **ateniuatorius** (lot. *attenuare* – sumažinti, sušvelninti), kuris gali nutraukti operono veiklą (jį turi aminorūgščių sintezės *his, trp* operonai);
- operonai skiriasi genų skaičiumi (2–10 ir daugiau).

Transkripto atžvilgiu:

- bendras transkriptas nuo viso operono trumpalaikis, vyksta bendra transliacija (kaip *lac* operono);
- transkriptas yra bendras nuo viso operono, bet po transkripcijos skyla į atskiras RNR (taip yra rRNR, histonų genų sankaupose);
- genai yra sutelkti vienoje vietoje, bet transkribuojami atskirai (kaip hemoglobinų α ir β-klasterių);



4.1 pav. ***Escherichia coli*** **arabinozės operonas:**
araO ir *araI* – lokusai, prie kurių jungiasi *araC* geno produktai – baltymas-represorius (P1) ir baltymas-aktyvatorius (P2), priklausomai nuo sąveikos su arabinoze, tas pats baltymas yra aktyvatorius arba represorius; C^C – geno *araC* konstitutyvi mutacija, po kurios *ara* operonas veikia nenutrūkstamai, nes P_1 nesugeba sąveikauti su arabinoze

- ir atvirkščiai, nors genai sutelkti vienoje vietoje, subrendęs transkriptas „sudurstytas" iš pavienių genų produktų (audinių suderinamumo genai).

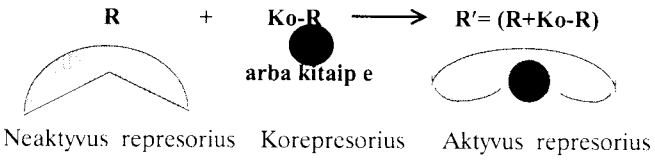
Valdymo pobūdžio atžvilgiu:

- skatinamas arba slopinamas;
- to paties geno-reguliatoriaus produktas gali būti ir represorius, ir aktyvatorius; taip yra *ara* (arabinozės metabolizmo) operone (4.1 pav.): geno-reguliatoriaus *araC* produktas gali būti ir represoriumi, kai jungiasi prie lokuso *araO* (operatoriaus), ir aktyvatoriumi, kai jungiasi prie kito lokuso, žymimo *araI* (iniciatoriaus). Šiuo atveju geno *araC* produktas yra susijungęs su arabinoze.

Skirtingai veikia ir aplinkos veiksniai, valdantys operono veiklą. Jie vadinami **efektoriais.** Efektoriai veikia:

- kaip induktoriai (pvz., *lac* operono induktoriai galaktozidai);
- kaip represoriai – slopina operono veiklą. Taip veikia aminorūgštys histidinas, triptofanas ir kt., kai jų pasigamina per daug. Tokie aplinkos veiksniai vadinami **korepresoriais**. Jie, panašiai kaip galaktozidai, irgi sąveikauja su geno-reguliatoriaus produktu

represoriumi, bet šis vienas yra neaktyvus, t. y. neslopina operono. Jis slopina tik po sąveikos su korepresoriumi:

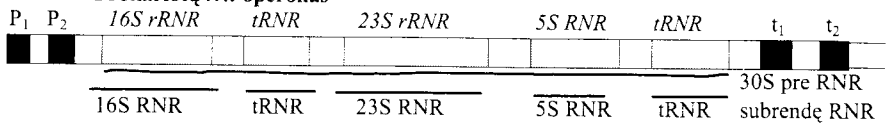


Čia R – pirminis represorius, geno-reguliatoriaus produktas; Ko-R – korepresorius, arba efektorius (nenurodant jo veiklos pobūdžio); R′ – aktyvusis represorius, po sąveikos su Ko-R, arba kompleksas (R+Ko-R). Panašios efektoriaus sąveikos gali vykti ir su geno-aktyvatoriaus produktais (vadinamaisiais apoinduktoriais)

Operonai eukariotų genome. Operonas atrastas bakterijose. Kažkodėl įsigalėjusi nuomonė, kad eukariotams operonai nebūdingi. Iš tiesų eukariotų genai, lemiantys tą patį požymį, procesą, dažniausiai ne sutelkti į vieną bendrą grupę, o išsibarstę po įvairius lokusus ir chromosomas. Tačiau eukariotų genai vienijami bendrai veiklai kitu principu: turi tapačias valdymo sekas ir valdomi tų pačių valdymo genų produktų, panašiai kaip bakterijų *ara* operonas. Tokia genų grupė vadinama **regulonu**. Regulonai yra ir pagrindinės prokariotų genų grupės (*E. coli* – jiems priklauso apie 70% visų genų).

Tačiau nuomonė, kad eukariotams nebūdingas operonas, yra neteisinga ir net nesuprantama, nes vienas svarbiausių operonų, būtent *rrn*, būdingas tiek prokariotams, tiek eukariotams. Tiesa, jis gerokai skiriasi, bet eukariotai turi viena rRNR daugiau.

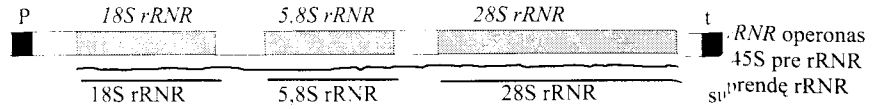
Prokariotų *rrn* operonas



Ypatybės: 2 promotoriai (P_1 ir P_2); 2 terminatoriai (t_1 ir t_2); *5S RNR* genas; tRNR genai – įvairiose kartotinėse sankaupose (*E. coli* genome jų yra 7) skiriasi.

P_1 promotorius – pagrindinis. Jis yra stiprus. P_2 promotorius – silpnas, jis veikia tada, kai P_1 yra nuslopintas. Pvz., kai yra aminorūgščių badas. Tada slopinama rRNR sintezė, bet sustiprėja aminorūgščių sintezė. Kaip tik tada suaktyvėja P_2.

Eukariotų ribosominių *RNR* operonas:



Ypatybės: nėra *5S rRNR* geno, bet yra *5,8S rRNR* genas; *5S rRNR* genai sudaro atskiras kartotinių genų sankaupas; visas operonas koduoja tik rRNR; bręstant iš pre rRNR pašalina apie 48% viso pirminio transkripto – dideli transkribuojami tarpikliai.

Kaip minėta III skyriuje, eukariotų genome rRNR genų sankaupai būdinga dar viena ypatybė: šie genai sudaro **kartotinių genų sankaupas.** Jų skaičius somatinėse ląstelėse gali kisti dėl genomo pertvarkos.

Kartotinių genų sankaupas sudaro ir *5S rRNR* genai. Jiems būdingi labai dideli tarpikliai tarp šių genų. *Xenopus 5S rRNR* genų sankaupoje pseudogenai periodiškai kaitaliojasi su aktyviaisiais *5S rRNR* genais. Stabili jų padėtis sankaupose ir chromosomose verčia manyti, kad vis dėlto pseudogenai turi kažkokią neaiškintą paskirtį.

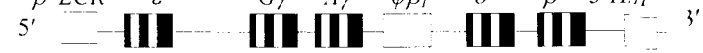
4.2. Hemoglobino genų sankaupos ir jų evoliucija

Žmogaus ir kitų žinduolių genome yra **dvi globinų sankaupos** (klasteriai): α ir β.

Žmogaus genome:

– ***α-sankaupa*** **vieta** – 16p13.11-13.33 (pačiame šešioliktosios chromosomos trumpojo peties gale), **ilgis** – apie 30 kb, **genai** – trys veiklūs ζ (dzeta), α_2 ir α_1, 3 pseudogenai $\psi\zeta$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$ ir vieno (θ_1) paskirtis neaiški, valdymo sekos – *HS–40*:

– ***β-sankaupa*** **vieta** – 11p 15.5 (irgi trumpojo peties gale), **ilgis** – apie 60 kb, **genai** – 5 veiklūs ε, $G\gamma$, $A\gamma$, δ, β ir vienas pseudogenas $\psi\beta_1$:



Tamsiai pavaizduoti egzonai, šviesiai – intronai.

Žinduolių genome hemoglobino genų valdymo ypatybės yra dvi:

- suderinta α ir β-sankaupų veikla,
- genų veikla susijusi su individualia organizmo raida.

Genų veiklos ypatumai. Viena iš žinduolių individualios raidos ypatybių yra tai, kad 3 kartus keičiasi O_2/CO_2 apykaitos sąlygos. Iš pradžių besidalijančias gemalo ląsteles aprūpina O_2 ir šalina CO_2 gretimos ląstelės, paskui O_2/CO_2 apykaita vyksta per virkštelę, ir nuo gimimo visą gyvenimą kvėpuojama burna ir plaučiais. Genų veikla yra suderinta su šiais O_2/CO_2 apykaitos pokyčiais.

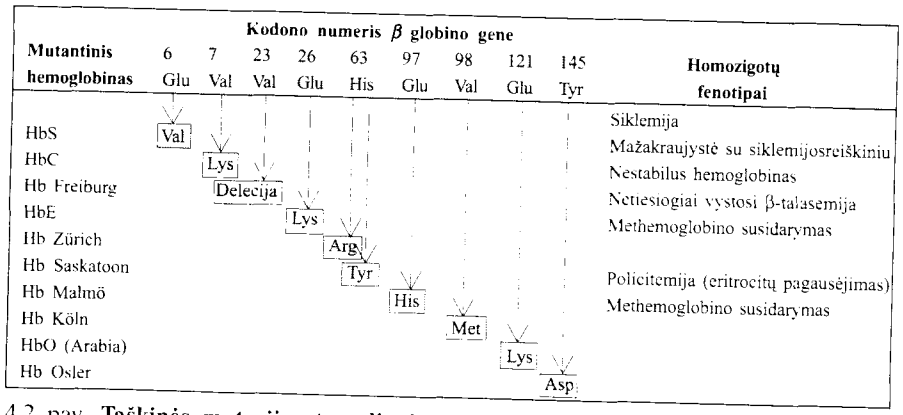
Gemalo (iki 8 savaičių amžiaus), vaisiaus ir suaugusio žmogaus hemoglobinai skiriasi:

- gemalo – $\zeta_2\varepsilon_2$ (Hb Gower 1), $\zeta_2\gamma_2$ (Hb Portland) ir $\alpha_2\varepsilon_2$ (Hb Gower 2);
- vaisiaus – $\alpha_2\gamma_2$ (HbF),
- suaugusiojo – 97% sudaro hemoglobinas $\alpha_2\beta_2$ (HbA), 2% – $\alpha_2\delta_2$ (HbA2) ir apie 1% – $\alpha_2\gamma_2$.

Taigi abiejose genų sankaupose (α ir β) vieną veiklų geną keičia kitas veiklus genas. Jose genai išsidėstę pagal veiklos (raiškos) laiką. Pirmieji yra atitinkamai ζ ir ε genai, juos keičia α ir γ genai, paskui γ geną keičia β genas. Vadinasi, dviejų genų sankaupų – α ir β – veikla yra suderinta. Įdomu tai, kad abiejose genų sankaupose lemtingų genų kaitos momentų vietas skiria arba pseudogenai, arba didesnis atstumas tarp genų.

Hemoglobino genų mutacijos. Iš apie 300 β-globino ir apie 100 α-globino ištirtų mutacijų didelę dalį sudaro tokios taškinės (*misens*) mutacijos, kur viena aminorūgštis pakeista kita (4.2 pav.).

Hemoglobino pavyzdžiu galima parodyti, kokia sudėtinga yra **multimerinių baltymų genetika**, ypač jeigu tai yra heteromultimerinis baltymas kaip hemoglobinas, kuris sudarytas iš 4 polipeptidų:



4.2 pav. **Taškinės mutacijos transliuojamojoje β-globino geno dalyje**

pvz., 2-jų α ir 2-jų β, t. y. $\alpha_2\beta_2$. Hemoglobino mutacijos rodo, kaip gali sutrikti gerai suderinta sistema net nedalyvaujant valdymo genams.

Antai sergant chroniška mažakraujystės forma **talasemija,** yra sutrikusi α- arba β-globinų sintezė:

- **α-talasemija** – sutrikusi α-globino sintezė,
- **β-talasemija** – sutrikusi β-globino sintezė,
- **βδ-talasemija** – sutrikusi δ- ir β-globinų sintezė.

α genų sankaupoje yra du nealeliniai α genai (duplikacija), todėl gali būti labai įdomi talasemijos priklausomybė nuo genų dozės. Kartu tai labai geras polimerija vadinamos genų sąveikos ir su šia sąveika susijusio reiškinio *kiekybinių požymių* (medicininėje genetikoje – *slenkstinės genų dozės*) paveldėjimo pavyzdys (žr. p. 629).

Esant polimerijai, liga pasireiškia tik peržengus tam tikrą slenkstinę genų dozę.

Hemoglobinų genų dozės santykius labai patogu tirti: jie pasireiškia tarp minimalaus nealelinių genų skaičiaus – 2-jų α genų porų:

- kai 4 veiklūs genai (po 2 homologinėse chromosomose), norma;
- kai veiklūs 3 genai, „tylus nešiotojas“;
- kai veiklūs 2 genai, α-talasemija, bet galimi du variantai:
  - *α-thal-1* – po deleciją abiejuose α lokusuose,
  - *α-thal-2* – delecija (homozigota) kurio nors α geno abiejose homologinėse chromosomose;
- kai veiklus 1 genas, esti ryškus β-polipeptido perteklius, todėl gali susidaryti neįprastas tetrameras β_4 – vadinamoji HbH liga; nors silpnai, bet pažeista ir psichika;
- 0 veiklių genų – letali anomalija *hydrops fetalis* (vaisiaus vandenė); vaisius žūva gimstant arba iki gimimo.

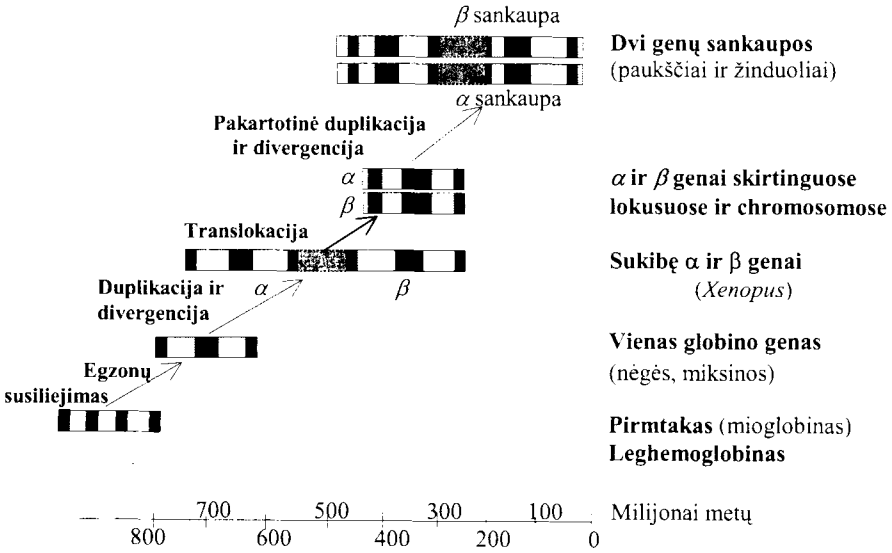
HPFH, stambios delecijos ir genų susiliejimas. Gali atsitikti taip, kad dėl tarpiklio delecijos (riboje, skiriančioje du genus) genai susilieja. Pirmą kartą šis reiškinys nustatytas bakteriofago T4 *rII* rajone tarp cistronų *A* ir *B* (žr. p. 61). Tokia pati delecija, tik stambesnė, aptikta tarp genų δ ir β, užgriebianti ir dalį (apie 7%) šių dviejų genų sekų, todėl abu genai neveiklūs. Kita genų δ ir β dalis susiliejusi – yra **Hb Lepore**. Kitais atvejais delecijos dar stambesnės, 45–100 kb dydžio. **Hb Kenya**

iškritusi β-sankaupos dalis nuo $A\gamma$ geno galo iki β geno galo. Visais atvejais, kai nepažeistas nors vienas γ genas, atsitinka, kad ir suaugusio asmens eritrocituose sintetinamas **fetalinis (vaisiaus) hemoglobinas** $\alpha_2\gamma_2$. Reiškinys sutrumpintai vadinamas **HPFH** (angl. *hereditary persistence of fetal hemoglobin*).

Nestabilūs hemoglobinai – dar vienas būdas, kaip gali išsiderinti polipeptidų kompleksas multimeriniame baltyme. Delecijos arba duplikacijos lemia nestabilų hemoglobiną, nes vienas polipeptidas (α arba β) yra ilgesnis už kitą. Tokia padėtis gali atsirasti ir dėl insercijų (Hb_{Cr} – hemoglobinas Cranston – įsiterpę du nukleotidai A ir G) arba mutacijų, dėl kurių susidaro „ištisinio skaitymo" (žr. p. 68) baltymai, tokie kaip hemoglobino Constant Spring (vietoj stop kodono UAA yra CAA).

Lyginamoji hemoglobinų genetika/hemoglobinų evoliucija. Lyginamoji hemoglobinų genetika yra lyderio pozicijose. Pirma, tai kol kas vienas iš nedaugelio atvejų, kai morfologinę-funkcinę (kvėpavimo sistemos ir organų) evoliuciją galima sieti su genų evoliucija. Antra, tiesiog chrestomatiškai galima pademonstruoti visus pagrindinius geno evoliucijos momentus (4.3 pav.).

Pradinis genas gyvūnų genomuose nežinomas. Jį atitinka augalų gumbelinių bakterijų **leghemoglobinas**. Jis turi ne tris, o keturis egzonus. Matyt, vyko dviejų egzonų, surišančių hemą, susiliejimas į vieną. Primityviosios žuvys turi tik vieną globiną, o amfibija *Xenopus* jau turi du atskirus α ir β globino genus.



4.3 pav. **Hemoglobino genų evoliucija:** juodai – egzonai, pilkai – intronai, užbrūkšniuota – tarpikliai tarp genų (remiantis B. Lewin, 2000)

Jiems atsirasti turėjo vykti du įvykiai – **duplikacija** ir **divergencija** (lot. *diverge* – išsiskirti) dėl mutacijų kaupimosi duplikuotuose genuose. Skirtumai tarp duplikuotų genų pagaliau susikaupė tokie dideli, kad jie tapo nealeliniais genais.

Sudėtinga abiejų (α ir β) sankaupų genetinė sandara aiškiai nulemta išėjimo į sausumą – kvėpuoti deguonimi iš oro. Na, o sudėtinga individuali raida ir su ja susijusi genų kaita jau aptarta. Ji ir nulėmė tai, kad atsirado dvi (α ir β) globinų genų sankaupos. Būtent sankaupoje, matyt, lengviausia valdyti suderintą genų veiklos kaitą.

Kaip išlieka nepakitę duplikuoti genai? Šis klausimas kyla išnagrinėjus genų sankaupas, kuriose yra duplikuoti genai. Ribosominių ir pernašos RNR kartotinių genų sankaupos yra ištisai iš tokių duplikuotų genų. Globino α-sankaupoje yra du tapatūs α (α_1 ir α_2) genai, o β-sankaupoje – du γ ($G\gamma$ ir $A\gamma$) genai. Skiriasi jie, kaip minėta, tik tuo, kad koduoja baltymą su viena pakeista aminorūgštimi (Gly arba Ala, tačiau šie skirtumai pastovūs). Duplikuotuose genuose per milijonus metų turėjo kauptis mutacijos. Ir jeigu nevyko divergencija, palaikoma atrankos, tai bent turėjo atsirasti šių **genų populiacijos**. Taip yra su imuniteto ir citochromų P450 genais (žr. toliau).

Duplikuotų genų pastovumas turi būti specialiai palaikomas.

Kaip tai vyksta, kol kas konkrečiai nenustatyta, aiškinama įvairiai.

4.3. Imunogenetika. Imuniteto genai, jų pertvarka ir valdymas

4.3.1. Bendras apibūdinimas ir imuniteto genų evoliucija

Nepaliaujama kova „parazitas-šeimininkas". Tai amžinai nesiliaujantis „karas". Į kiekvieną šeimininko priemonę atsikratyti parazitu šis atsako prisitaikydamas prie jos arba net „išrasdamas" naują būdą, kaip įveikti šeimininko pasipriešinimą. Čia atranka labai stipriai palaikė kiekvieną „naujovę", ir imuniteto evoliucija vyko labai sparčiai.

Dažnai atsakoma net tuo pačiu „ginklu". Jau trumpai aptarėme *Trypanosoma VPG* (variabiliojo paviršinio glikoproteino) genų pernašą į telomerinius galus, kur šie genai yra aktyvūs. Dėl tokios genomo pertvarkos *Trypanosoma* maždaug kas savaitę pakeičia vieną paviršinį

glikoproteiną – **antigeną** kitu. Nespėja šeimininkas **antigenui sukurti antikūną**, o jau viskas keičiasi, reikia naujo baltymo.

Bet lygiai toks pat „išradimas" panaudojamas ir stuburinių gyvūnų limfocituose. Vyksta vadinamoji imunoglobulinų klasių kaita (žr. toliau). Mat parazito ląstelės įsigudrina sintetinti paviršinius ląstelės baltymus, panašius į šeimininko antikūnus, ir jų neskiria šeimininko imuniteto sistema.

Nustatyta, kad naujas augalų atsparumo parazitui genas gali būti veiksmingas 5, daugiausia 10 metų, todėl ligoms atsparios veislės turi būti nuolat keičiamos naujomis. Pasaka be galo... Ir tai nepriklauso nuo metodų, nes pastaruoju metu labai sėkmingai atsparios veislės kuriamos genų inžinerijos metodais. Parazitas po kiek laiko vėl prisitaikys prie naujo atsparumo geno.

> **Imunitetas** (lot. *immunitas* – nepriklausomumas nuo ko) – organizmo atsparumas užkrečiamosioms ligoms, svetimiems genetiniams veiksniams (pvz., plazmidėms), nuodams, pagaliau savo paties ne vietoj ir ne laiku besidalijančioms ląstelėms.

Imunitetas parazitui yra labai sudėtingas požymis, todėl sudėtinga ir šio požymio genetika. Be to, įvairių organizmų grupių, pvz., augalų ir gyvūnų, ji yra specifinė.

Tai:

- **bendri, nespecifiniai – fiziniai apsaugos būdai,** susiję su nepralaidumu ir fiziniu parazito pašalinimu (oda, gleivinė, ašaros, bakteriocidinės organizmo skysčių savybės); panašių apsaugos priemonių (tik specifinių pagal jų sandarą ir biologiją) turi ir augalai;
- **įgimtas imunitetas** parazitams, būdingiems organizmo aplinkai; ir šis teiginys vienodai teisingas gyvūnams ir augalams, šio tipo imunitetas gali būti specifinis net skirtingiems organizmų kamienams, veislėms, populiacijoms, rasėms. Pvz., europiečių didesnis atsparumas tuberkuliozei, žmogaus atsparumas gyvūnų ar augalų ligų sukėlėjams ir pan.;
- **specifinė ir labai sudėtinga organizmo reakcija į antigenus**, paprastai į parazito ląstelės paviršinius baltymus. Ši sistema būdinga stuburiniams. Toliau *Trypanosoma* pavyzdys rodo, kad ji gali pasitaikyti ir kitose organizmų grupėse (gal priskirti prie „užmirštų, prarastų evoliucijos atradimų").

Selekcijoje kaip tik naudojamasi genais, nuo kurių priklauso paveldimas, įgimtas imunitetas; ieškoma tokio atsparumo būdų ir genų.

Stuburiniai gyvūnai turi specialias ląsteles, kuriomis ryja ir suskaido bakterijas, pirmuonis, ląsteles ir ląstelių liekanas, kitokias smulkias daleles. Tai **leukocitai** ir **makrofagai**. Skiriama humoralinė ir ląstelinė apsauga.

Humoralinis atsparumas gali būti bendras ir specifinis. Kraujo serume ir kituose skysčiuose yra specifinių ypatingų baltymų – antikūnų. Šis specifinis atsparumas gali būti perduotas neatspariam asmeniui serumo injekcijomis.

> Stuburiniai gyvūnai turi specifinę ir indukuojamą imuninę sistemą, kuri pažįsta ir pašalina svetimus patogenus bei medžiagas. Ji vadinama **imuniniu atsaku,** o medžiaga, sukelianti imuninį atsaką, **antigenu.** Imuninį atsaką lemia B ir T limfocitai ir makrofagai.

Tai sistema ne tik prieš infekciją, bet ir prieš vėžines ląsteles, skaidanti nenormalias ląsteles. Žmonės, kurie genetiškai arba dėl pašalinių priežasčių (pvz., dėl ŽIV) turi sutrikusią imuninę sistemą, labai lengvai pažeidžiami.

B limfocitai gamina antikūnus – **dvi imunoglobulinų versijas**:

- **humoralinę**, laisvą organizmo skysčiuose (serume),
- **ląstelinę**, transmembraninę (ląstelės paviršinius baltymus).

B limfocitai gaminasi kaulų čiulpuose.

T ląstelės gamina paviršinį, transmembraninį baltymą – **T receptorių**. Tai baltymas, būtinas ląsteliniam atsakui. T ląstelės baigia bręsti čiobrialiaukėje (*tymuse* – iš čia **T** raidė, kaip ir **B** – angl. *bone* – kaulas). Sergantys paveldima Di George liga neturi čiobrialiaukės arba yra jos hipoplazija. Jie labai jautrūs infekcijai, praradę ląstelinį atsaką.

T limfocitai sudaro specializuotas **subpopuliacijas**:

- T_c (arba T_k) – **citotoksinių ląstelių,** arba kilerių (žudikių);

- T_h – helperių (padėjėjų): padeda kitoms ląstelėms diferencijuotis ir dalytis, sąveikauja su T_c ir B limfocitais;
- T_s – supresorių: manoma, kad šios ląstelės skirtos imuniniam atsakui valdyti.

Vieni limfocitai citologiškai nesiskiria nuo kitų. Skirtumai aptinkami pagal jų produkuojamus baltymus. Taigi produkuojamieji baltymai vartojami kaip žymekliai vienam limfocitų tipui atskirti nuo kito. Antai B limfocitai produkuoja imunoglobulinus, o T limfocitai – T receptorių (TCR). Tolesnės tokių žymeklių paieškos padėjo aptikti **CD** (angl. *cell differentiator*) baltymus.

Visos T ląstelės turi CD3. Jo paskirtis – perduoti signalą iš ląstelės paviršiaus į ląstelės gilumą, kai prie T limfocito prisijungia antigenas.

T_h limfocitai atskiriami nuo T_c pagal CD4 ir CD8:

- T_h turi TCR^+, $CD3^+$,$CD4^+$,$CD8^-$,
- T_c turi TCR^+, $CD3^+$,$CD4^-$,$CD8^+$.

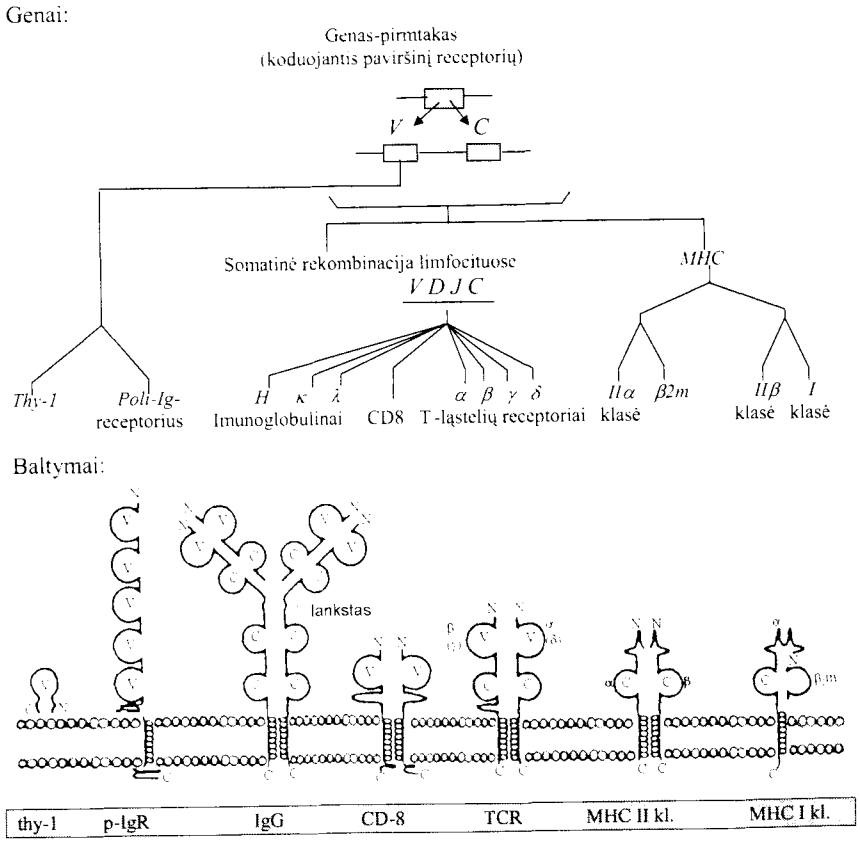
Išmokus atskirti ląsteles, buvo ištirta jų paskirtis. Pvz., nustatyta, kad T_h ląstelėms tenka centrinis vaidmuo: be jų organizmas praranda imuninio atsako gebėjimą. ŽIV virusas, sąveikaudamas su CD4, patenka į T_h ląstelių vidų ir jas sunaikina. Šio įvykio pasekmės žinomos: stiprus imuninis nepakankamumas (imunodeficitas).

CD baltymai dalyvauja atpažįstant savus ir svetimus baltymus-antigenus. Paprastai imuninė sistema yra tolerantiška savo paties baltymams. Tačiau būna, kad ši tolerancija sutrinka, imuninio atsako ląstelės neatskiria, kas sava, o kas svetima, prasideda **autoimuninė liga.** Ji atspindi negerą organizmo genotoksikologinę būseną, todėl genetikai autoimuninei ligai skiria daug dėmesio.

MHC baltymai sudaro trečią stambią baltymų grupę. Juos koduojantys genai yra vienos kilmės su imunoglobinų ir T receptorių genais. MHC baltymų paskirtis irgi yra panaši – reaguoti į svetimus paviršinius ir savus endogeninius, bet nereikalingus baltymus. MHC baltymai yra paviršiniai antigenai. Jie neišpasakytai įvairūs, kiekvieno individo saviti. Tai yra pagrindinė audinių ar organų persodinimo kliūtis. Iš čia kilęs jų pavadinimas – MHC (angl. *major histocompatibility complex* – svarbiausias, pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas).

Imuninio atsako ir MHC genų evoliucija. Pakanka palyginti šių dviejų baltymų superšeimų erdvinę sandarą (4.4 pav.), ir paaiškėja, kad visi jie yra vieno geno – „Adomo" – vaikai, vienakilmiai. Visi turi 1–3 konstantinius (C) domenus, variabiliuosius (V) domenus. Seniausiais laikomi timozino (*Thy*-1) ir poli-Ig-receptoriaus genai. Jie kildinami iš vieno pirminio ląstelių paviršinio receptoriaus geno, kuris po duplikacijos ir divergencijos tapo sudarytas iš dviejų dalių, koduojančių C ir V domenus.

Tolesnis imuninio atsako – MHC genų evoliucijos tempas tiesiog fantastiškas, neturintis analogų. Rezultatas – taip pat. Atsiradusios pirmosios antigenus surišančios molekulės ir visa sistema evoliucionavo į imunoglobulinus, T receptorius, MHC. Šių superšeimų viduje



4.4 pav. **Imuninio atsako ir MHC genų evoliucija ir baltymų sandaros palyginimas**

irgi vyko sparti evoliucija. Antai primityvūs stuburiniai, pvz., rykliai, turi tik vienos klasės imunoglobulinus IgM, o žmogus turi 5 klases Ig. Be to, kai kurios jų skirstomos į subklases: IgG yra 4 subklasės, IgA – 2 subklasės, vadinasi, pakankamai ryškiai divergavusios.

Visiškai tikėtina, kad ši sistema evoliucionuoja ir toliau. Pvz., plintant AIDS/ŽIV, turi atsirinkti variantai, atsparūs šiam virusui, t. y. variantai, kurių T_h ląstelių neįveikia ŽIV. Jau šiuo metu aišku, kad ir pagal atsparumą ŽIV žmonės sudaro populiaciją: vieni užsikrėtę ŽIV suserga ir miršta, kiti yra tik ŽIV viruso nešiotojai, o tokių, kurie visiškai atsparūs, neimlūs šiai infekcijai, – kol kas nustatyti neįmanoma. Nebent atsitiktinai.

Susikūrė genetinė somatinių ląstelių diferenciacijos sistema, lemianti faktiškai neribotą ląstelių įvairovę su neribotu deriniu baltymų, galinčių reaguoti į bet kurį iš anksto nežinomą antigeną.

Žmogaus kūne yra apie $1 \cdot 10^{12}$ B limfocitų, o šie savo ruožtu turi apie 10^8–10^9 skirtingų receptoriaus specifiškumų. Be to, su tuo pačiu antigenu gali sąveikauti ne vienas B limfocitų tipas. Antikūnas sąveikauja ne su visu antigenu, o tik su jo dalimi, kuri vadinama **epitopu**, arba **antigeniniu determinatorium**. Tai dar labiau padidina galimų sąveikų „antikūnas-antigenas" skaičių, nes vieni antikūnai pažįsta vieną epitopą, o kiti – kitą to paties antigeno epitopą. Kiekvieno limfocito paviršiuje yra apie 10^5 molekulių transmembraninių baltymų, kurie yra antigenų receptoriai arba susiję su šių veikla.

Kaip atsiranda tokia didelė diferencijuotų ląstelių įvairovė? Vyksta sudėtingas, bene pats sudėtingiausias iš iki šiol nagrinėtų **genomo pertvarkos** tipų.

4.3.2. Imunoglobulinų genų populiacija ir rekombinacija somatinėse ląstelėse

Antikūnai yra priderinti prie antigenų. Tad ilgą laiką pati didžiausia imunologijos ir genetikos mįslė buvo tai, kaip iš anksto limfocitai numato, su kokiais antigenais jiems teks susidurti.

Dar 1950 m. Jernė (N. K. Jerne) ir Barnetas (F. M. Burnet) su bendradarbiais pasiūlė hipotezę, kad vyksta limfocitų **kloninė atranka**. Iš pradžių tai buvo tik tuščia idėja, bet Barnetui ir jo bendradarbiams iš tikrųjų pavyko įrodyti, kad susidaro diferencijuotų limfocitų klonai (žr. toliau).

Labai svarbūs imuninio atsako esmei atskleisti buvo pačių imunoglobulinų sandaros ir įvairovės tyrimai.

Imunoglobulinų sandara dabar yra gerai ištirta. Ji priklauso nuo imunoglobulino (Ig) klasės. Jų yra penkios: IgM, IgD, IgG, IgE, IgA.

IgG yra 4 subklasės, IgA – 2 subklasės. IgM yra pentameras, o IgA – dimeras.

IgM – pirmoji klasė, diferencijuojanti B limfocitus, ir pirmoji imuninio atsako klasė. Aktyvina komplementą.

IgD laisvo labai nedaug, tik B limfocitų paviršiuje. Kol nėra IgM ir IgD, tol nėra ir imuninio atsako.

IgG yra daugiausia. Jo ir IgM santykis 12:1. IgG genas pradeda veikti imuninio atsako 1-ojo etapo pabaigoje ir 2-ajame etape, kai bakterijų ląstelės ir virusai yra ardomi. IgG pristato ardomas ląsteles makrofagui. Tai vienintelė Ig klasė, kuri praeina pro placentą.

IgE yra labai mažai (tik 0,001 viso IgM kiekio) skatina maitinančias ląsteles, taigi ir imuninį atsaką, todėl sergant bronchine astma, esant anafilaksijai ir kt., padaugėja 3–4 kartus.

IgA (jų irgi palyginti daug, 3 kartus daugiau negu IgM). Jie yra seruminiai ir ypač sekreciniai – ašarose, prakaite, seilėse, piene, žarnyno ir kvėpavimo takų gleivėse. Sąlygoja vietinį imunitetą.

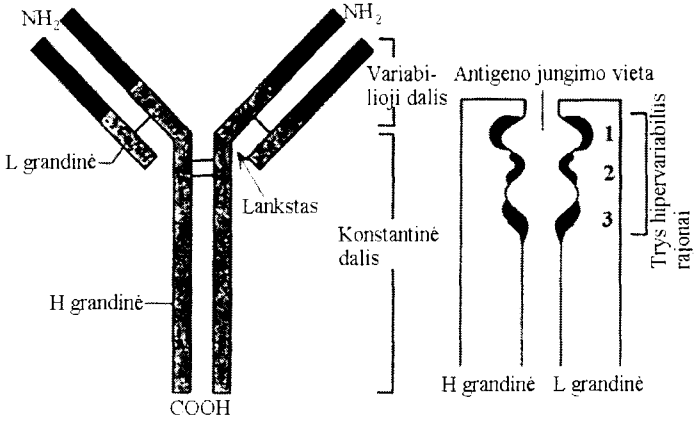
Imunoglobulinų klasės skiriasi viena nuo kitos **C** domenu: **IgM** turi C_μ; **IgG** – $C_{\gamma 1\text{-}\gamma 4}$ (yra 4 subklasės); **IgD** – C_δ; **IgE** – C_ε; **IgA** – $C_{\alpha 1\text{-}\alpha 2}$ (yra 2 subklasės).

Visų Ig monomerų sandara panaši: sudaryti iš dviejų L (angl. *light*, 22 kDa) ir dviejų H (angl. *heavy*, 50–70 kDa) grandinių. Visos L grandinės susideda iš 2-jų domenų: V (variabiliojo) ir C (konstantinio). H grandinėse irgi yra tik po vieną V domeną, bet C domenų skaičius įvairus: 3–4. Grandinės viena su kita ir domenų galai sujungti disulfidiniais tilteliais –S–S–.

Kiekvienas Ig monomeras panašus į Y raidę: iš 2-jų „pečių" ir vienos „kojos". „Koją" su „petimi" jungia lankstas. Ir iš tiesų lankstas pečiams suteikia lankstumo, gebėjimo keisti padėtį.

V domenai yra dviejų tipų: κ (kapa) ir λ (liambda). Santykis tarp šių dviejų tipų toks: pelių 95:5, žmogaus 70:30. Veiklos skirtumų tarp κ ir λ nenustatyta.

Kiekviename V domene yra po 3 vadinamąsias hipervariabiliąsias sritis (4.5 pav.). Jomis ir prisiderina antikūnas (Ig) prie antigeno. Hipervariabiliosios L ir H grandinių sritys sudaro lyg ir kišenę, į kurią „įkišamas" antigenas. Dėl lankstumo, kurį suteikia molekulės



4.5 pav. **Imunoglobulino molekulės monomero sandara (kairėje) ir antigeno jungimo vieta (dešinėje)**

„pečiams" lankstas, ta pati molekulė gali iš karto sąveikauti su dviem antigenais arba su to paties antigeno dviem epitopais (arba kitaip – su antigeno determinantais).

Imunoglobulinų genų populiacija. Apie 1965 m. imunoglobulinų sandara ir dauguma klasių buvo gana gerai ištirtos, bet žinios apie jų genus buvo labai menkos. Todėl daugeliui genetikų 1965 m. paskelbta Drejerio (W. Dreyer) ir Beneto (J. C. Bennett) hipotezė, kad V ir C domenų genai yra atskirai, bet ankstyvojoje B limfocitų raidoje **jie sujungiami į vieną bendrą geną**, be to, įvairiuose B limfocituose skirtingai, ir kad V genų yra šimtai, o gal tūkstančiai, atrodė kaip didžiausia nesąmonė. Net vėliau, sukūrus genų inžinerijos metodus, atrodė neįtikėtina, kad ląstelėje natūraliai vyksta toks sudėtingas genų konstravimas.

Tačiau 1976 m. japonų mokslininkas Tonegava (S. Tonegawa) visa tai įrodė ilgamečiais bandymais su pelių mielomos ląstelėmis. Mieloma vystosi jau iš diferencijuotų B limfocitų, kurie gamina vieno tipo monokloninius antikūnus, taigi šie Ig yra vieno konkretaus geno produktai.

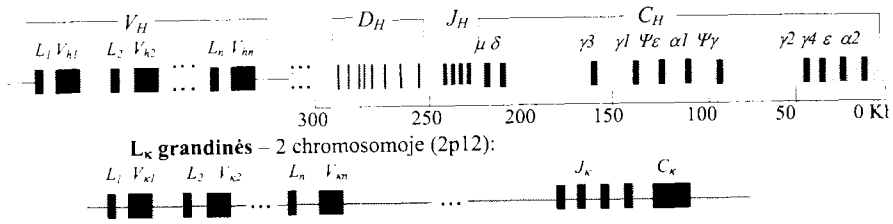
Ig sąveikauja su antigenu V domenais, ir iš tiesų V genų yra daug. Žmogaus genome:

- H grandinės V domenas koduojamas ~ 300–1000 *V* genų,
- L_κ " " " ~ 300 *V* genų,
- L_λ " " " ~ 300 *V* genų.

Be to, galimų derinių skaičių padidina:

- H grandinių 4 *J* (angl. *joining* – jungtis), 12 *D* (angl. *diversity* – įvairovė) ir 9 *C* genai.
- L_κ – 4 *J* genai, 1 *C* genas,
- L_λ – 6 *JC* genai.

Imunoglobulinų genų yra 3 sankaupos. Kaip ir hemoglobinų sankaupos, jos yra skirtingose chromosomose: žmogaus H grandinės – 14 chromosomoje (14q32):



L_λ grandinės – 22 chromosomoje (22q11).

L_λ genų klasteris žmogaus genome atrodo panašiai kaip ir L_κ genų, bet pelės genome yra tik du λ genai ir susidaro tik dviejų tipų Igλ.

Rekombinacija *Ig* genų sankaupose ir konkretaus *Ig* geno konstravimas. Vystantis B limfocitui, kiekviename iš trijų *Ig* lokusų susidaro po vieną konkretų *Ig* geną:

- *L* grandinės gene susijungia po vieną *V*, *J* ir *C* geną,
- *H* grandinės gene – po vieną *V*, *D*, *J* ir *C* geną.

Kokiu deriniu šie genai jungiasi vienas su kitu, yra atsitiktinumas, todėl esant dideliam *V* genų skaičiui susidaro labai įvairūs genai. Įvairovę padidina ir *J* genai, o sunkiojoje (H) grandinėje dar ir *D* genai. Taigi kiekviename B limfocitų klone yra skirtingi *H* ir *L* genai. Šių genų derinių skaičius yra labai didelis, pvz.:

$V_1 \ldots V_n \ldots D_{1\text{-}12} \ldots J_{1\text{-}4} \ldots C$ arba $V_1 \ldots V_n \ldots D_{1\text{-}12} \ldots J_{1\text{-}4} \ldots C$, arba t.t...

V_{31} D_3 J_2C V_2 D_{12} J_2C

Galutinis genas $V_{31}D_3J_2C$ sankaupa **$V_2D_{12}J_2C$** sankaupa ir t. t.

Genai jungiasi tam tikra tvarka:

- H grandinės gene pirmiausia susijungia D_y *su* J_z, paskui prisijungia V_x, ir susidaro $V_xD_yJ_z$, ir tik po to prisijungia *C* genų sankaupa;
- L grandinės susijungia V_x su J_y, o prie jų prisijungia *C* genas.

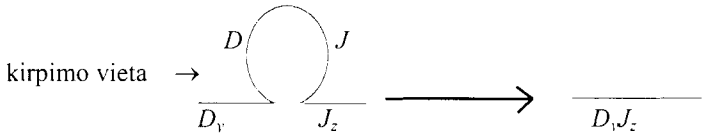
Susijungimas vyksta specialiu genų rekombinacijos (vadinamosios sait-specifinės) būdu, dalyvaujant fermentų kompleksui, kuris vadinamas **rekombinaze**. Jungiamasi specialiomis nekoduojančiomis nukleotidų sekomis, kurios vadinamos **atpažinimo (arba rekombinacijos signalo) sekomis.**

Kiekvienas *V* genas tokią seką turi 3′ gale, J genas – 5′ gale, o *D* genas – iš abiejų galų:

–CACAGTG– ... 12 arba 23 ... –ACAAAAACG–...
–GTGTCAC– tarpiklis –TG TTTTTGC–

Ir sekos, ir nukleotidų skaičius tarpiklyje yra labai konservatyvūs, t. y. pastovūs, bet netiksliai susijungiama 5′ ir 3′ galais. Į jungimosi vietas gali būti įterpti papildomi nukleotidai, todėl keičiasi *J* ir *D* geno dalys. Tai dar labiau padidina Ig įvairovę. Pagal kilmę šis įvairovės šaltinis vadinamas **jungimosi įvairove**.

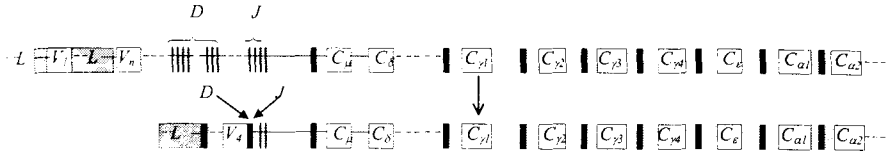
Nesigilinant į šių reiškinių ir rekombinacijos detales (tai specialaus „Imunogenetikos" kurso klausimai) vis dėlto nors bendrais bruožais reikia žinoti, kaip vyksta rekombinacija. Atitinkamai tarp *D* ir *J* arba *V* ir *DJ* (tas pat tarp *V* ir *J* lengvojoje grandinėje) susidaro kilpa, kuri nukerpama. Tai, kas liko, sudaro naujai konstruojamą geną ar jo dalį:



V geno hipermutabilumas – dar vienas *Ig* genų įvairovės šaltinis.

Pertvarkytuose *VJC* ir *VDJC* genuose nustatytas neišpasakytai didelis mutacijų dažnis. Be to, specifiškai vyksta tų nukleotidų sekų mutacijos, kurios koduoja hipervariabiliąsias Ig sritis (CDR1 ir CDR2). Mutacijos padidina Ig įvairovę 100–1000 kartų!! Šios valdomos mutagenezės mechanizmas kol kas nežinomas, bet nustatyta, kad šie genai yra aktyviai metilinami, todėl padidėjusi rizika mC virsti T. Be to, šie genai nereparuojami, todėl nepašalinamos DNR pažaidos (žr. p. 494). Mutacijos vyksta tik somatinėse ląstelėse ir ilgainiui kaupiasi. Taigi juo vėlesnės klasės Ig, tuo didesnė jo įvairovė, sukelta mutacijų.

Klasių kaita. Sukonstruoto sunkiosios grandinės (*H*) geno *C* dalyje yra visi *C* genai:

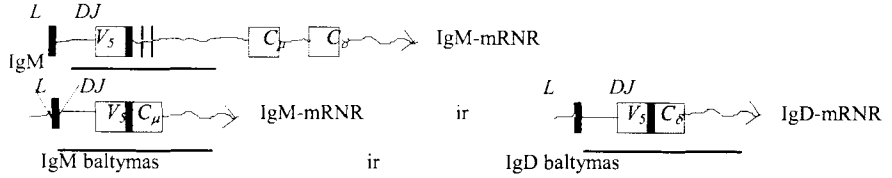


Visada veikia (išskyrus C_μ ir C_δ, kurie veikia atskirai arba kartu) pirmasis *C* genų sankaupoje esantis genas.

Klasių kaita vyksta dėl šių genų rekombinacijos ir veiklos pokyčių.

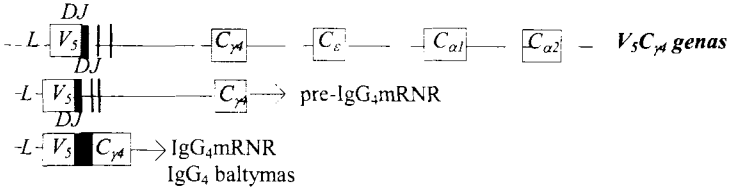
Pirminiai B limfocitai po *H* geno susidarymo sintetina IgM, kurį, kaip žinia, koduoja C_μ. Šie limfocitai dar nesubrendę, ir imuninis atsakas dar nepasireiškia. Tik kai kartu pradedami sintetinti IgM ir IgD, atsiranda imuninis atsakas.

C genų pertvarka tuo laiku nevyksta. Paprasčiausiai susidaro veiklios dviejų tipų mRNR dėl savito alternatyvaus splaisingo:



IgM ir IgD baltymai turi tą patį V domeną ir skirtingus C domenus.

Tolesnė **klasių kaita** vyksta dėl **genomo pertvarkos**, panašiai kaip ir *V* genų. Dalis *C* genų, atsiduriančių kilpoje, iškerpami. Iš likusių genų veikia pirmasis iš eilės – nuo 5′galo.



Klasė gali būti keičiama tik ta, kurios *C* genas chromosomos *H* lokuse dar išlikęs neiškirptas. Aukščiau pateiktame pavyzdyje tai būtų IgE, IgA1 arba IgA2.

Prieš kiekvieną *C* geną irgi yra specialios nukleotidų sekos, kurių paskirtis – klasių kaita.

Imunoglobulino įsiterpimas į membraną. Kiekvieno V geno 5′ dalyje yra L (lyderinė) nukleotidų seka, koduojanti baltymo domeną, kurio nėra subrendusiame Ig. Tai **signalinis polipeptidas**, reikalingas Ig įsiterpti į membraną. Bet tai nieko neįprasto. Signalinį polipeptidą koduoja visi transmembraninių ir sekretuojamų baltymų genai. Tačiau yra savitų, tik šiai genų grupei būdingų genų valdymo ypatybių ir reiškinių:

- imunoglobulino lokusų pertvarkos valdymas,
- monoalelinė raiška,
- limfocitų klonai ir imuninė atmintis.

***Ig* lokusų pertvarkos valdymas**. Pertvarka yra iš anksto numatyta, genetiškai užprogramuota. Tai rodo lokusų sandara:

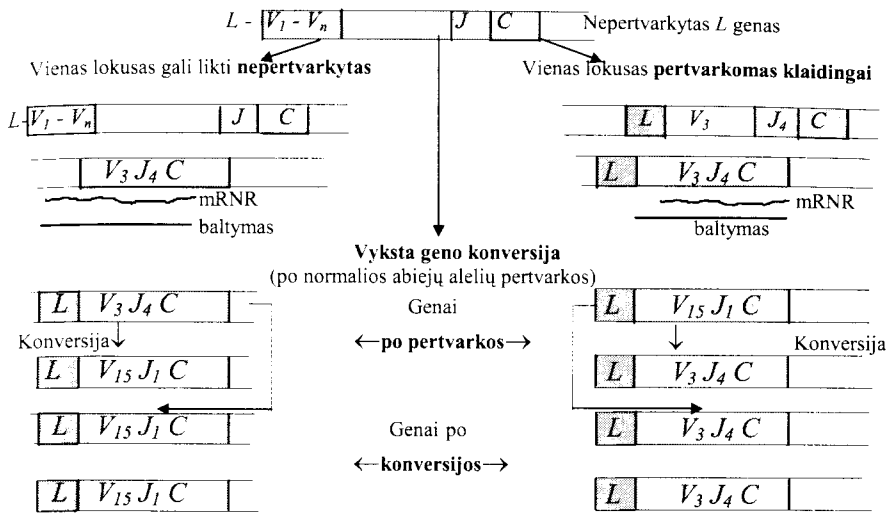
- specialūs genai – jungtukai (D, J);
- specialios rekombinacijos signalo sekos; joms sąveikaujant susidaro kilpa, kuri nukerpama ir pašalinama;
- specialūs fermentai – rekombinazės.

Net lokusų pertvarkos seka, kuriam lokusui pirmam persitvarkyti, yra valdoma. Pirmasis dažniausiai pertvarkomas *H* lokusas.

Vieno alelio „išjungimas“ (angl. *allelic exclusion*), arba **monoalelinė raiška**. Diploido ląstelių homologinėse chromosomose yra du to paties geno aleliai. Abu jie turėtų veikti, bet veikia tik vienas, yra monoalelinė raiška. Ji būdinga ir genomo imprintingui. Tačiau nors *Ig* genų monoalelinė ekspresija nepakankamai ištirta, jau dabar aišku, kad jos priežastys kitokios, negu genomo imprintingo.

Ig genų monoalelinė raiška priklauso nuo šių genų pertvarkos.

Reiškinys nepakankamai ištirtas, matyt, todėl, kad gali veikti keli alelio „išjungimo“ būdai:

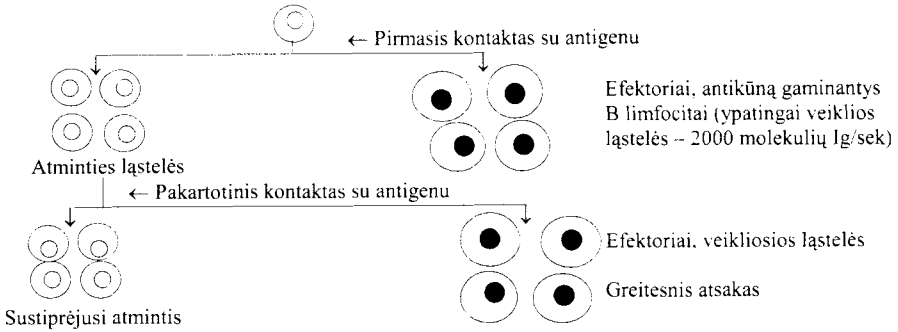


Geno konversija yra toks reiškinys, kai heterozigotose vienas alelis virsta kitu (žr. p. 644). Kad ir kokiu būdu tai atsitiktų, diferencijuotuose B limfocituose **veikia tik vienas alelis**, svarbiausia, **gaminasi tik vieno tipo imunoglobulinai**.

Štai kodėl ląstelių klonas (arba natūralus ir normalus, arba kaip nukrypimas – vėžinės mielomos ląstelės, arba dirbtiniu būdu gautos hibridomos ląstelės) sintetina tik vieno tipo (monokloninį) antikūną.

Limfocitų atranka ir klonai. Imuninė atmintis – vienas su kitu susiję reiškiniai. Idėja priklauso Barnetui ir jo bendradarbiams, labai nuosekliai įrodžiusiems, kad vyksta diferencijuotų limfocitų atranka. Atrenkami limfocitai, kurių gaminamas antikūnas geriausiai atitinka antigeną. Šie limfocitai labai sparčiai dalijasi sudarydami diferencijuotų limfocitų kloną.

Besidalijančios ląstelės yra dviejų tipų. Jos skiriasi dydžiu ir gyvenimo trukme. Smulkesnių ląstelių gyvenimo trukmė gerokai ilgesnė. Tai **atminties ląstelės**. Jomis įsimenamas pirmasis kontaktas su antigenu ir imuninis atsakas. Todėl antrą kartą susidūrus su tuo pačiu antigenu, reakcija į jį (antikūnų sintezė) labai paspartėja: būna 3–4 kartus greitesnė.



Po imuninio atsako ir imunoglobulinų lokusų pertvarkos susidaro unikalus darinys, kuris vadinamas **idiotipu**. Taigi klonuojamos vieno idiotipo ląstelės, nes šio idiotipo koduojami Ig geriausiai atitinka antigeną.

4.3.3. T limfocitų receptoriaus (TCR) ir audinių suderinamumo (MHC) genai

Neatsitiktinai šios dvi genų grupės, sudarančios dideles genų sankaupas, nagrinėjamos kartu. Nors audinių suderinamumo genai sutelkti į *MHC* sankaupą ir aptikti persodinant organus bei audinius (pirmiausia odą), jie tiesiogiai dalyvauja imuniniame atsake, kuriam T limfocitai ne tik „diriguoja". Jų koduojami baltymai TCR, CD3, CD4, CD8 tiesiogiai sąveikauja ir su MHC baltymais.

***ICR* genai ir jų pertvarka brėstančiuose T limfocituose**. *ICR* genams būdinga pertvarka tokia panaši į *Ig* genų pertvarką, kad net rekombinaciją atlieka tas pats fermentų kompleksas rekombinazė. Mat ir TCR genuose yra tokios pačios (7 ir 9 bp) nukleotidų sekos, kuriomis suartėjus susidaro kilpa. Pastaroji nukerpama ir buvę kilpoje genai pašalinami (ta DNR suskaidoma), o visi kiti segmentai sujungiami.

Skirtingus polipeptidus (α, β, γ, δ) koduoja skirtingi genai, konstruojami iš skirtingų genų sankaupų. Tačiau sankaupų yra ne 4, o tik 3, nes į α sankaupą įsiterpę δ genai; β ir γ sankaupos yra atskirai, bet abi toje pačioje žmogaus 7-ojoje chromosomoje, o αδ sankaupa atskirai – 14-oje chromosomoje.

TCR polimorfizmas irgi įspūdingas: gali būti 10^{15} įvairių TCR variantų. Toks skaičius yra ne tik dėl genų pertvarkos, kaip ir Ig, bet

TCR įvairovė atsiranda derinantis dviejų pertvarkytų genų produktams (α ir β polipeptidams). *TCR* genų pertvarka, kaip ir *Ig* genų konstravimas, segmentų jungimosi vietose vyksta netiksliai. Tai irgi padidina TCR įvairovę. Tačiau *TCR* genams somatinis hipermutabilumas nebūdingas.

Ląstelėje veikia tik vienas **TCR** geno alelis – pasireiškia monoalelinė raiška.

Ir šiuo reiškiniu TCR labai panašūs į Ig. Tačiau T limfocitai koduoja gerokai didesnį skaičių imuniniam atsakui labai svarbių ir būtinų baltymų (CD, citokinų). Tuo tarpu B limfocitai labiau specializuoti antikūnus sintetinti (žr. toliau).

Audinių suderinamumo kompleksas – MHC. Ir genai, ir jų koduojami baltymai pasižymi **didžiausiu žmogaus genome polimorfizmu**. *MHC* genų lokuso dydis irgi įspūdingas (4.6 pav.) – 4000 kb, jame per 100 genų. Žmogaus genome *MHC* genai užima visą 6-osios chromosomos trumpąjį petį (6p). Nepaisant dydžio, jis yra pirmasis visiškai sekvenuotas (dar 1992 m.) stambus žmogaus chromosomos segmentas.

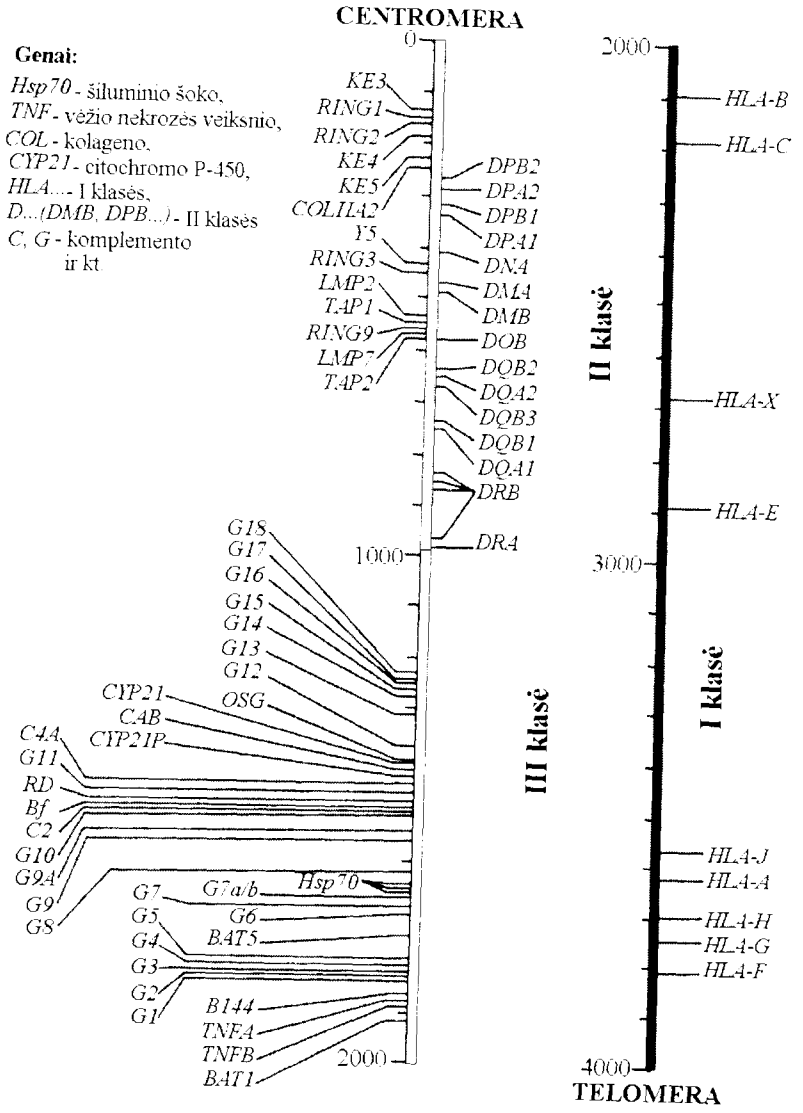
Geriausiai ištirtos yra žmogaus ir pelės *MHC* genų sankaupos, bet turi skirtingus pavadinimus:

- žmogaus – *HLA* (angl. *human leukocyte-associated antigens*),
- pelės – *H2* (angl. *histocompatibility*).

Čia nagrinėsime tik žmogaus *HLA* lokusą.

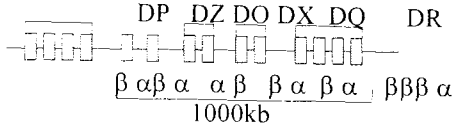
***MHC* koduojami baltymai skirstomi į I, II, III klasę.** Iš tikrųjų kai kurie šios genų sankaupos koduojami baltymai formaliai tiesioginio ryšio su imuniniu atsaku neturi, ypač III klasės baltymai. Antai III klasės genai koduoja komplemento baltymus C2 ir C4 (*C4A, C4B, C2* genai), šiluminio šoko atsako vieną svarbiausių baltymų Hsp70, citochromą P-450 (steroidų hidroksilazę), kuris atakuoja endogeninį substratą – steroidus (genas *CYP21*), vėžio nekrozės veiksnius (*TNFA* ir *TNFB* genai). Tačiau imuninė sistema veikia ir vėžines ląsteles (TNF), degradavusius arba nereikalingus baltymus (*Hsp70, CYP21* genai).

Jau tik žvilgtelėjus į piešinį (žr. 4.4 pav.), vaizduojantį I ir II klasės MHC, aišku, kad jie yra vienos kilmės su Ig ir TCR, irgi



4.6 pav. **Žmogaus *HLA (MHC)* lokusas**

atsiradę iš bendro protėvio geno dėl duplikacijų ir divergencijos. Kiekvieną domeną koduoja skirtingas genas. Genų konstravimas nevyksta, bet to paties polipeptido genai daug kartų pakartoti, skirtingi. Pvz., II klasės genai:



Čia yra tik dalis jų (plg. su 4.6 pav.). I kl. *MHC* genų yra apie 20, II kl. *MHC* genų – per 15. Labai daug yra pseudogenų ir kartotinių sekų. Šių sekų paskirtis neaiški.

Polimorfizmas sukuriamas visiškai kitokiu būdu negu Ig ar TCR:

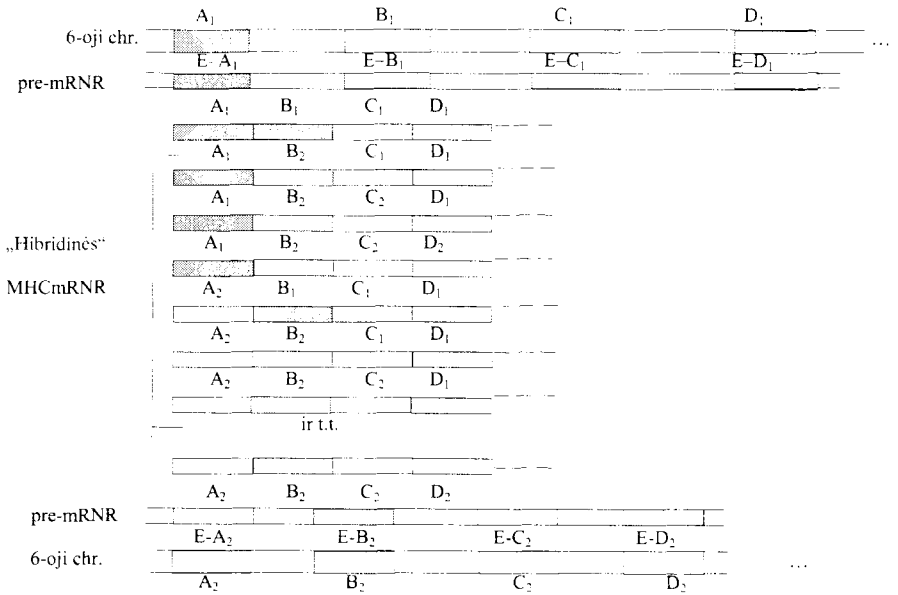
- kaip minėta, genų daug;
- kiekvienas genas turi iki 150 alelinių formų, kiekvieno jų heterozigotiškumas sudaro nuo 10 iki 90%;
- veiklūs abu aleliai (bialelinė raiška), pasireiškia kodominavimas: yra abiejų alelių produktai, jų deriniai duoda skirtingus fenotipus.

Nors genai nekonstruojami, bet **krosingoveris** *HLA* sankaupoje vyksta labai netolygiai. Kai kuriose vietose jis itin dažnas, kitose atvirkščiai, slopinamas, pvz., tarp genų *DQA* ir *DRB* (II kl.). Manoma, kad tokiu būdu valdomas atsparumą infekcijoms lemiančių alelių dažnis. Ypač jeigu krosingoverį lydi dažna **geno konversija – vieno alelio virsmas kitu.**

Haplotipas. Dėl didelės alelinių genų gausos ir rekombinacijos tarp genų *HLA* lokuso (6p) viduje kiekvieno žmogaus *HLA* lokuse susidaro nepakartojamas įvairių *MHC I* ir *II* klasės genų derinys. Šis derinys pavadintas **haplotipu**.

Haplotipas – tai artimai sukibusių genų ir jų alelių derinys toje pačioje homologinėje chromosomoje. Tai miniatiūrinis, nedidelės genomo dalies genotipas.

MHC haplotipai sudaro sąlygas saveikai tarp geno produktų – brėstant MHCmRNR. Manoma, kad net kiekvieną MHC baltymų domeną koduoja gana savarankiškas genetinis vienetas. Tas savarankiškumas ir pasireiškia brėstant MHCmRNR. Brėstant mRNR, ji gali susidaryti „hibridinė", t. y. iš abiejų diploidinio organizmo *HLA* lokusų, esančių abiejose homologinėse 6-osiose chromosomose. *HLA* lokuso, kaip ir kitų imuninio atsako (*Ig, TCR*) lokusų, ypatybė ta, kad vieną baltymo domeną koduoja vienas egzonas. Taigi brėstant mRNR, įvairiais deriniais gali derintis HLAmRNR egzonai, koduojami homologinių chromosomų:



Tai gali būti viena iš priežasčių, kodėl šiek tiek skiriasi to paties asmens įvairių audinių ląstelės paviršiniais antigenais. Šie skirtumai svarbūs audinių nesimaišymui, autonomijai. Tačiau šie skirtumai gali atsirasti ir bręstant baltymams, juos modifikuojant skirtingais būdais.

***MHC* veikla.** I ir II klasės MHC baltymai pristato antigeną (baltymą) T ląstelėms.

Pagal pristatymą I ir II klasės MHC baltymai yra specializuoti. Specializacija yra pagal dvi ypatybes:

- **kokioms ląstelėms pristatomi antigenai**:
  - I klasės MHC baltymai antigeną pristato CD8+T_c ląstelėms (kileriams);
  - II klasės MHC baltymai antigeną pristato CD4+T_h (helperiams); pastarieji savo ruožtu skatina B limfocitus gaminti antikūnus;
- **kokius antigenus skaido ir suriša visa veikianti sitema** (nes veikia ne tik MHC I ir II klasės baltymai):
  - I klasės MHC paprastai pristato endogeninius (vidinius) baltymus;
  - II klasės MHC pristato egzogeninius baltymus.

I klasės MHC baltymai dažniausiai atakuoja virusinius baltymus prieš virusui baigiant bręsti. Bet ši sistema veikia ir prieš kitus endoparazitus, vėžines ląsteles, baltymų atplaišas, kurios, pvz., susidaro degraduojant baltymams po šiluminio šoko. T_c limfocitai užmuša visas šias ląsteles. I klasės MHC baltymus gamina visos (ar beveik visos ląstelės).

II klasės MHC baltymai sintetinami, kai atsiranda išorinių baltymų, kurie į ląstelę yra patekę endocitozės būdu.

***MHC* genų evoliucija** susijusi su tais veiksniais, prieš kuriuos MHC baltymai nukreipti. Labai stiprus *MHC* genų atrankos veiksnys yra virusai. Nobelio premijos laureatai Cinkernagelis (R. M. Zinkernagel) ir Dohertis (P. C. Doherty) nustatė, kad įvairūs *I klasės MHC* aleliai lemia atsparumą skirtingiems virusams ir kitiems endogeniniams parazitams. Antai atsparumas maliarijai priklauso ne tik nuo hemoglobino genų mutacijų, bet ir nuo *MHC* (*DR1, BW53*) alelių. Šie aleliai išplitę Vakarų Afrikoje.

Amerikos indėnai yra neatsparumo europietiškoms užkrečiamoms ligoms (gripui, tuberkuliozei) pavyzdys: 56 mln. indėnų žuvo dėl šių ligų. Indėnai turi labai mažai *HLA-A* alelių. Tačiau pastaruoju metu indėnų genome atsirado bei plinta nauji *HLA-B* aleliai. Šio skyriaus pradžioje minėta, kad panašaus reiškinio reikėtų tikėtis ŽIV viruso atžvilgiu. Tai **mikroevoliucija, kuri vyksta ir šiuo metu, nepaliaujamai**, dėl amžinos kovos „parazitas-šeimininkas".

MHC specialiosios formos. *MHC* genai dėl išnagrinėtų veiklos ypatybių yra vieni seniausių tarp visų imuninio atsako genų. Veikiant atrankai, atsirado labai siauros specializacijos *MHC* genų. Pvz., *HLA-DM* genas koduoja pagalbinį baltymą, kurio paskirtis – sukurti kitų baltymų tretinę sandarą, prižiūrėti, „kad visi būtų savo vietose". Tokie baltymai vadinami **šaperonais** (pranc. *chaperone* – moteris, kurios paskirtis buvo prižiūrėti jaunas paneles, kad šios, „neiškrypdamos iš kelio", patektų iš taško A į tašką B...).

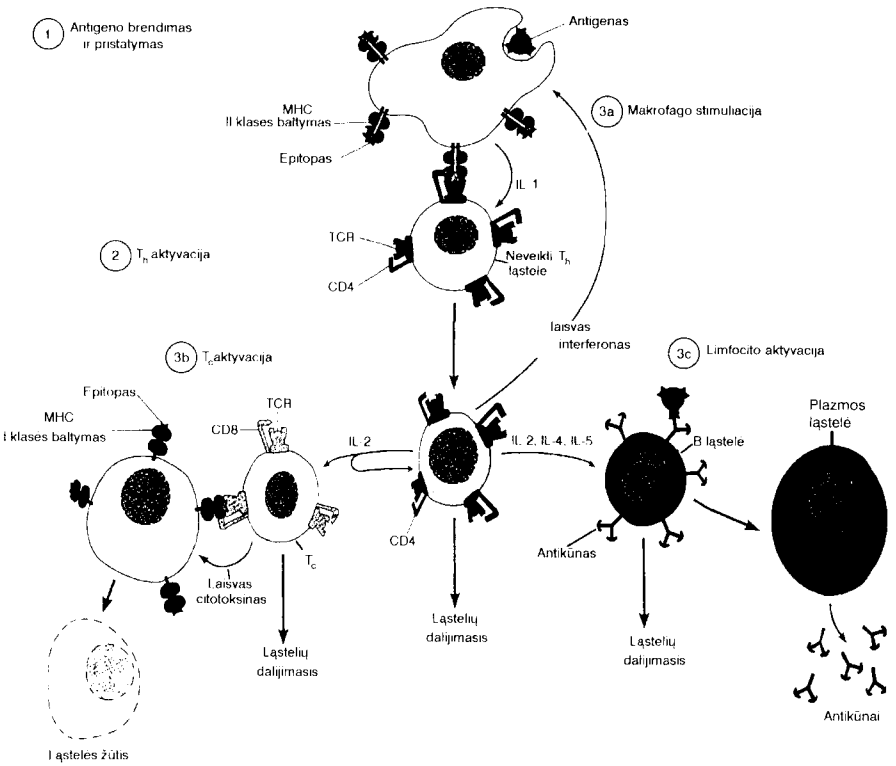
Kai kurie genai **dar labiau specializuoti ir veikia dar trumpiau.** Antai *HLA-G* veikia tik išoriniuose trofoblastuose, saugo pradėjusias dalytis embriono ląsteles, kurios genetiškai yra pusiau transplantantas, nes turi pusę chromosomų, svetimų motinos kariotipui, – būtent iš tėvo, šalia kitų genų ir lemiančius *MHC* haplotipus (genų derinius, lemiančius I klasės baltymus).

Vieninga sistema. Visos imuninio atsako sistemos tokioje glaustoje kurso dalyje išnagrinėti neįmanoma. Tik trumpai išnagrinėti imuninio atsako „pagrindiniai veikėjai": Ig, TCR, I ir II klasės MHC. Juos reikia papildyti baltymais, kurie neminėti (pvz., interferonais,

daugeliu CD baltymų, kurių jau yra apie 100), arba tokiais, kuriuos suminėjome tik prabėgomis (pvz., CD3). Visa ši sudėtinga sistema veikia darniai, kaip vienas vienetas (4.7 pav.).

Tai vieninga sistema, kurioje dera

- universalios formos su siaurai specializuotomis formomis,
- konstitutyvios formos (pvz., I kl. MHC) su indukuotomis formomis. Be to, visą laiką yra tam tikras pastovus, bet žemas lygis tų formų, kurios yra indukuojamos. Nuo to priklauso visos sistemos patikimumas.



4.7 pav. **Imuninis atsakas**

4.4. Citochromų P-450 genų populiacija. Ksenobiotikų biodegradacijos genetika

4.4.1. Ksenobiotikų biodegradacija ir jos fazės. Citochromai P-450 ir jų genai

Panašiai kaip imuninio atsako veikia ir kita labai stambi genų grupė, lemianti ksenobiotikų metabolizmą – biodegradaciją.

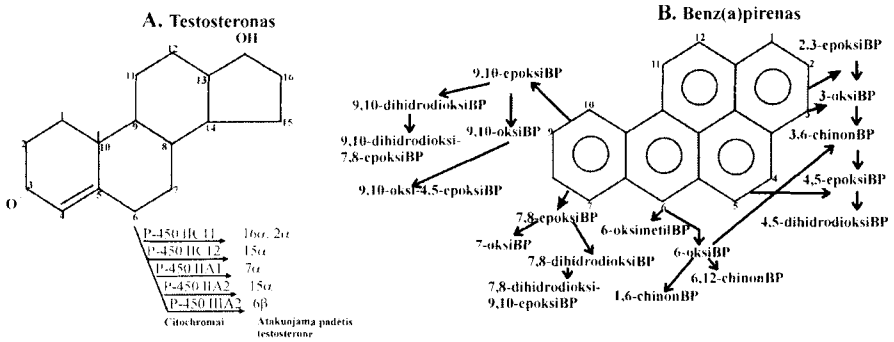
Ksenobiotikai – svetimos, nebūdingos organizmui medžiagos.

Tai detergentai (įeinantys į skalbimo priemonių sudėtį), įvairios kilmės vaistai, įvairūs pesticidai ir kt. Daugelis jų ne tik nuodingos medžiagos, bet ir tiesiogiai ar netiesiogiai yra **mutagenai, kancerogenai**. Būtent šios jų savybės skatina tirti ksenobiotikų metabolizmą. Organizme šie junginiai patiria **biotransformaciją**: arba suskaidomi, arba paverčiami junginiais, kurie lengvai pasišalina iš organizmo. Metabolizmo pobūdis labai priklauso nuo to, ar organizmai turi aktyvią šalinimo sistemą.

Konkrečių ksenobiotikų biotransformacijos fermentų poreikis iš dalies prognozuojamas iš anksto. Tai priklauso nuo istorinės taksono patirties, kuri sukaupta vykstant rūšies evoliucijai (žr. toliau). Egzistuoja labai didelė **citochromų P-450 genų populiacija**.

Ksenobiotikų atžvilgiu organizmo strategija labai panaši į imuninio atsako strategiją, nes panašūs tikslai: nukenksminti svetimas organines medžiagas arba nereikalingų savų medžiagų perteklių, nes ksenobiotikų biotransformacija nukreipta ir prieš endogeninius substratus. Maža to, pirmieji šios sistemos baltymai (pirmieji citochromai P-450) buvo skirti endogeniniams substratams – cholesterolio junginiams skaidyti. Kaip ir imuninio atsako,

- yra **universalios** ir **specializuotos** konkrečiam ksenobiotikui sistemos;
- veikiančios **visą laiką** (lemiamos konstitutyvių genų) ir indukuotos biodegradacijos formos;
- sistemos yra **dubliuotos,** tą patį ksenobiotiką atakuoja įvairiose padėtyse skirtingos to paties fermento izoformos (4.8 pav., *A*) arba skirtingos fermentų sistemos skaido **įvairiais būdais** (4.8 pav., *B*).



4.8 pav. **Testosterono ir benz(a)pireno (BP) metabolizmas žiurkių kepenų mikrosomose:**
A – pavaizduotos tik konstitutyviosios citochromo P-450 izoformos (remiantis V. Kobliakovu, 1990)

Ksenobiotikų biodegradacijos/biotransformacijos fazės. Šalinimo neskiriant į atskirą trečią fazę daugelio ksenobiotikų metabolizmas skirstomas į dvi fazes.

I biotransformacijos fazėje riebaluose tirpūs ksenobiotikai virsta vandenyje tirpiais metabolitais, įgyja reaktyvių grupių: OH, NH_2, COOH, SH. Vyrauja monooksigenazinio tipo (dviejų elektronų pernašos) reakcijos: vienas molekulinio deguonies atomas prijungiamas prie substrato (R), o kitas yra redukuojamas į H_2O.

Dažniausiai deguonies atomas įterpiamas tarp C ir H atomų; susidaro hidroksilo grupė (dviejų elektronų reakcija):
$RH + O_2 + 2\bar{e} + 2H^+ \rightarrow ROH + H_2O$.

Būtinas laisvasis deguonis (O_2). Šio tipo reakcijas vykdo citochromo P-450 fermentinė sistema:

- **citochromas P-450** (hemoproteinas),
- **NADPH–citochromo P-450 reduktazė** (flavoproteinas),
- **fosfolipidai** (pvz., fosfatidilcholinas).

Šio tipo reakcijų alternatyva yra **tiesioginė elektrono pernaša** susidarant laisvam kationo radikalui (vieno elektrono reakcija). Čia deguonis nereikalingas, jo atomas gaunamas iš peroksidų ir prijungiamas prie substrato. Tai atlieka **peroksidazės**. Šią reakciją gali katalizuoti ir citochromas P-450, bet ir jam būtinas H_2O_2.

Vieną sistemą gali keisti kita. Tas pats ksenobiotikas gali būti aktyvinamas ir vienokiu, ir kitokiu būdu. Antai iš benz(a)pireno (BP) pirmuoju būdu susidaro labai aktyvūs 7,8-dioliai, antruoju būdu – kationo radikalas (4.8 pav., *B*). Kuris būdas vyraus, labai priklauso nuo objekto ir net nuo to paties organizmo skirtingų audinių. Augalų ląstelėse vyrauja peroksidazinė sistema. Odoje yra tik 2–6% citochromo P-450 aktyvumo, palyginti su kepenimis.

Daug ksenobiotikų metabolitų, atsiradusių po I fazės reakcijų, yra mutageniški, todėl labai svarbu, kad tuoj pat vyktų II fazės reakcijos.

II ksenobiotikų biotransformacijos fazėje vyksta konjugacijos reakcijos. Jas patiria ir endogeninės medžiagos: hormonai, katecholaminas, bilirubinas ir kt. Šioje fazėje prie I fazėje susidariusio metabolito (jeigu junginys tirpus vandenyje, ir apeinant pirmąją fazę) fermentai prijungia įvairius junginius:

- **UDP-gliukuronoziltransferazės** perneša **gliukurono rūgštį** nuo UDP-gliukurono rūgšties ant metabolito; susidaro **gliukuronidai;**
- **glutation-S-transferazės** prijungia **glutationą;** galutinai susidaro **merkaptorūgštys**;
- **arilsulfotransferazės** prijungia **sulfato liekaną** nuo 3′fosfoadenozin-5′fosfosulfato (PAPS);
- **peptidai,** dažniausiai **glicinas, prijungiami** prie aromatinių karboksirūgščių (benzenkarboksirūgštis + glicinas = hipuro rūgštis; ši reakcija daroma kepenų detoksikacijos funkcijai patikrinti);
- **acetilinimas** ksenobiotikų, kurie turi aminogrupę (aromatinių aminų, sulfamidų, hidrazinų).

Konjugacijos reakcijomis ksenobiotikai galutinai nukenksminami; tada šalinami metabolitai. Tačiau ir po II fazės reakcijų gali atsirasti mutageniškų metabolitų. Antai labai stiprūs mutagenai yra 1,2-dichloretano ir 1,2-dibrometano junginiai su glutationu.

Ksenobiotikai ir jų metabolitai gali būti kaupiami (deponuojami) vakuolėse, augalų ląstelių sienelėse, kai kuriuose audiniuose. Tai irgi būdas apsisaugoti nuo žalingo šių junginių poveikio.

Daugelis fermentų (UDP-gliukuronoziltransferazės, glutation-S--transferazės, arilsulfotransferazės, peroksidazės) turi izoformų, būdingų konkretiems substratams arba audiniams, tačiau šių fermentų genetika nėra taip gerai ištirta, kaip imuninio atsako baltymų, todėl apsiribokime tik citochromais P-450.

Citochromų P-450 genai. Tai viena iš stambiausių genų populiacijų. Visos citochromo (c.) P-450 izoformos sudaro šeimas ir pošei-

20. 1313

mius. Šeimų yra daugiau kaip 20 (jos žymimos romėniškais skaitmenimis, pošeimiai – didžiosiomis raidėmis, izoformos ir genai – arabiškais skaitmenimis, pvz., citochromai P-450 IA1, IIC13; genai atitinkamai: *CYP1A1, CYP2C13* ir pan.).

Kaip minėta, įvairios citochromų P-450 izoformos sąveikauja su skirtingais substratais:

- IA (2 genai, *CYP1A1* ir *CYP1A2*), izoformos IA1 substratai yra policikliniai arenai (PAA, žr. p. 467), o izoformos IA2 – aromatiniai aminai, aminorūgščių pirolizės produktai;
- IIA1 (genas *CYP2A1*) oksiduoja testeroną, be to, labai specifiškai – tik 7-ojoje padėtyje;
- IIB (4 genai) substratai yra įvairūs ksenobiotikai;
- IIC (13 genų, iš jų 5 konstitutyvūs, kitus indukuoja fenobarbitalis (žr. toliau), šeimos izoformos sudaro didžiąją šiuo metu žinomų konstitutyviųjų citochromų P-450 dalį;
- IIE (2 genai), substratai yra etanolis, acetonas, N-dimetilnitrozoaminas ir kai kurie kiti nitrozojunginiai. Įdomu, kad genų induktoriai yra ne tik etanolis, acetonas, bet ir fiziologinės būsenos, kurioms esant organizme gaminasi ketonai: būtent diabetas, badavimas. Štai dėl ko badaujant padidėja mutacijų;
- IVA1 (genas *CYP4A1*) specifiškai oksiduoja riebalų rūgštis ir kt.

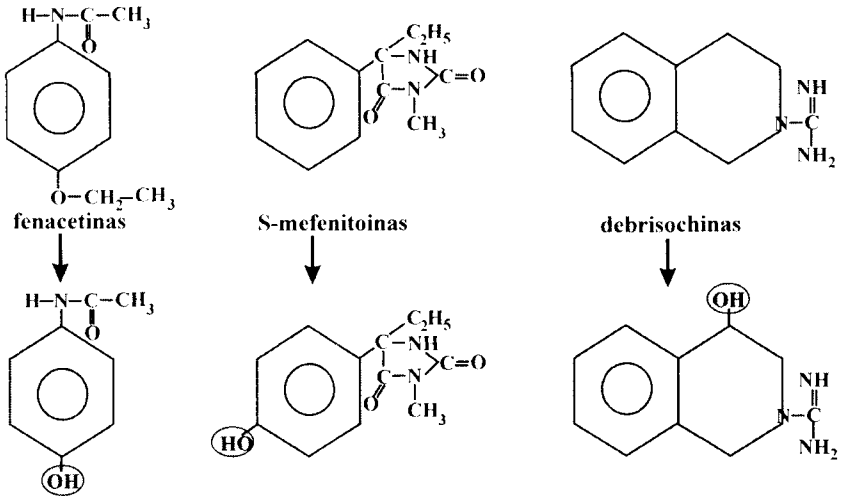
Citochromų P-450 izoformų įvairovė gerokai didesnė negu yra *CYP* lokusų. Tai priklauso nuo kelių priežasčių:

- kiekvienas genas gali turėti savo alelines išraiškas (kai kurių genų aleliai ir polialelizmas nustatyti);
- dauguma citochromų P-450 genų yra sudėtingos sandaros, sudaryti iš 7–9 egzonų, todėl gali vykti alternatyvus splaisingas ir transsplaisingas;
- šie genai sudaro populiaciją ne tik pagal genų produktus, bet ir pagal genų valdymo būdus (žr. toliau).

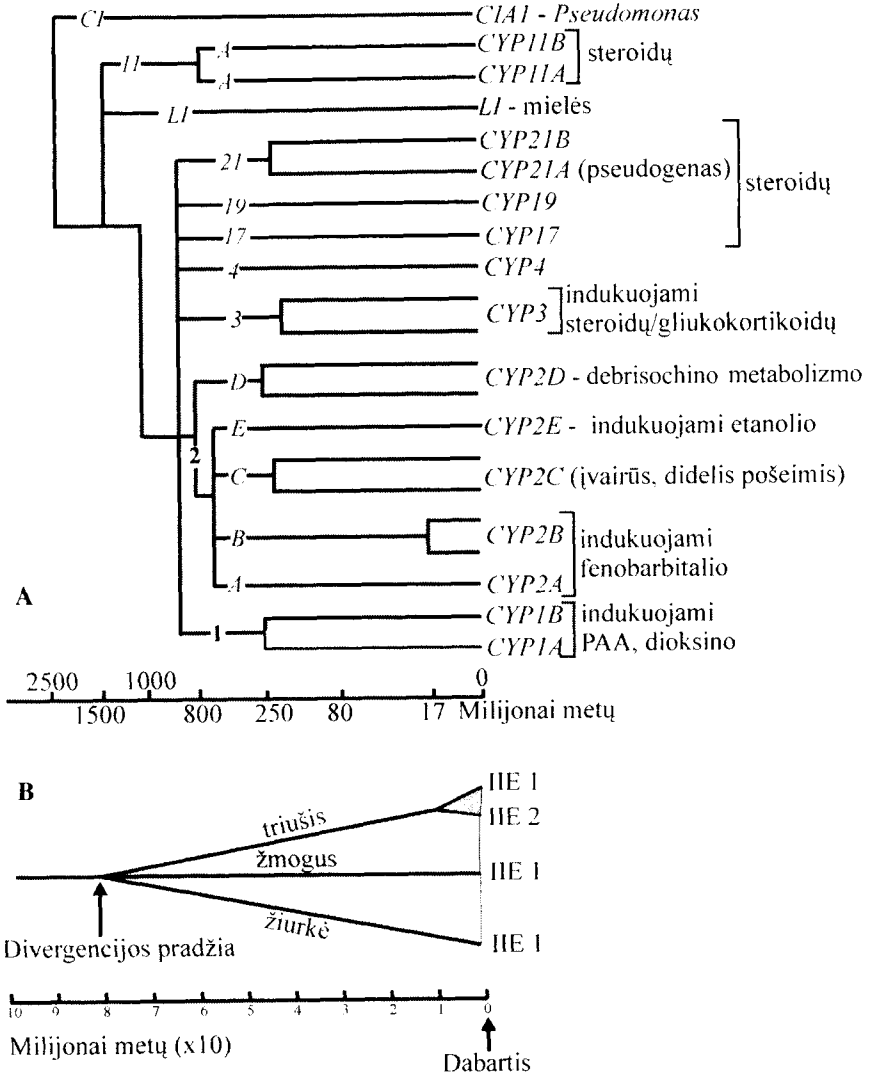
Substratai-žymekliai. Žmonės labai įvairiai reaguoja į tą patį kancerogeną-mutageną. Šio reiškinio priežasčių daug, bet viena iš jų – citochromų P-450 izoformos. Tačiau tiesiogiai tirti P-450 ir jo izoformas yra sunku metodiškai, ir todėl individuali žmonių analizė labai ribota. Sumanyta konkrečių asmenų P-450 izoformų aktyvumą įvertinti pagal tipiškas konkrečiai citochromo P-450 izoformai reakcijas: naudojantis substratais-žymekliais (4.9 pav.). Pvz., norint įvertinti izoformos IA2 kiekį (aktyvumą), nustatoma, kiek iš fenacetino pasigamino paracetamolio. Substratų paieškos tęsiamos.

Naudojantis substratais-žymekliais, ištirtos stambios žmonių grupės, net populiacijos. Nustatyta, kad stipriai ir silpnai metabolizuojančių asmenų santykis populiacijoje dažniausiai pasiskirsto pagal Mendelio, Hardžio-Vainbergo dėsnius: dominuoja stipriai metabolizuojantys asmenys. Tačiau alelių pasiskirstymas priklauso nuo žmonių rasės, populiacijos. Antai silpnai metabolizuojančių S-mefenitoiną (citochromas P-450 IIC8-10 izoformų substratas-žymeklis) baltaodžių ir kinų yra apie 5%, o japonų net 18–23%. Nustebino labai didelis žmonių polimorfizmas pagal kai kurias P-450 izoformas. Antai pagal citochromo P-450 IA2 izoformą, nustatomą substratu-žymekliu fenacetinu, žmonės skiriasi vienas nuo kito 100 ir daugiau kartų. Prisiminkime, kad ši forma aktyvina aromatinius aminus ir aminorūgščių pirolizės produktus. Pastarieji labai kancerogeniški.

Citochromų P-450 genų evoliucija. Kaip ir imuniteto, hemoglobinų genai, citochromų P-450 genai yra turėję vieną bendrą pirmtaką (4.10 pav., *A*). Citochromo P-450 **pirmtakas** atsirado **bakterijose** prieš maždaug 2 milijardus metų. Prieš 1,5 milijardo metų išsiskyrė prokariotai ir eukariotai. Tai buvo lemtingas citochromų P-450 genų evoliucijos momentas, nes prokariotų citochromų P-450 genų divergencija buvo labai silpna. Susikūrė tik viena genų šeima (*CI*). Tuo tarpu



4.9 pav. **Žmogaus citochromo P-450 genų markeriniai substratai:**
1 – fenacetinas ⟶ paracetamolis = *CYP1A2*; 2 – S-mefenitoinas ⟶ 4-hidroksimefenitoinas = *CYP2C8*; 9 ir *10*; 3 – debrisochinas ⟶ 4-hidroksidebrisochinas = *CYP2DB*



4.10 pav. **Visų citochromų P-450 genų (*A*) ir citochromo P-450 IIE (*B*) evoliucija:** pilkame fone – ksenobiotikų metabolizmo citochromų P-450 šeimos ir pošeimiai

eukariotams būdinga labai intensyvi *CYP* genų divergencija į daugelį šeimų. Antai, prieš 1,1 milijardo metų išsiskyrė genai, kurie koduoja citochromo P-450 izoformas, katalizuojančias endogeninių ir egzogeninių substratų biotransformaciją (*CYP11*). Mat pačios seniausios citochromo P-450 formos katalizavo tik endogeninių substratų (cholesterolio junginių) metabolizmą. Prieš maždaug 900 milijonų metų atsirado steroidų metabolizmo P-450 šeimos (*CYP17, 19, 21*).

Šių genų šeimų koduojami citochromai P-450 svarbūs normaliai žinduolių raidai. Antai *CYP11* ir *CYP21* genų šeimų mutacijos sukelia moteriškąjį pseudohermafroditizmą (kariotipas XX, su išsivysčiusiomis kiaušidėmis, bet sutrikusia genitalijų raida), o *CYP17* šeimos mutacijos, atvirkščiai, sukelia vyriškąjį (XY) pseudohermafroditizmą.

Tik prieš maždaug 800 milijonų metų pagaliau atsirado genai, kurie koduoja izoformas, katalizuojančias ksenobiotikų biotransformaciją. Taip žolėdžiai gyvūnai prisitaikė prie augalinių toksinų. Tolesnė citochromų P-450 genų divergencija vyko labai sparčiai.

Kaip ir kitų genų, citochromų P-450 genų evoliucija vyko dėl duplikacijų, genų mutacijų ir translokacijų. Dėl to citochromų P-450 genai tapo išbarstyti po įvairias chromosomas. Žmogaus citochromų P-450 yra bent 8 chromosomose. Taigi jei įvyktų vieno lokuso delecija, liktų veiklūs *CYP* genai kitose vietose ir kitose chromosomose.

Gyvenimo būdas, ekologija skatino atsirasti naujas citochromų P-450 izoformas. Antai IIE1 (CYP2E1) atsirado prieš 80 milijonų metų. Šio citochromo P-450 substratai yra nitrozoaminas, etanolis, ketonai. Tačiau triušio gyvenimo būdas paskatino tolesnę geno divergenciją į atskiras dvi izoformas:

- vienos substratas etanolis (IIE2),
- antros – nitrozoaminai (IIE1) (4.10 pav., *B*).

Žalioje žolėje daugiau nitrozoaminų pirmtakų. Žolei kaistant gaminasi alkoholis. Dėl to triušis tapo genetiškai užprogramuotu „alkoholiku".

4.4.2. Citochromų P-450 genų valdymo ypatumai. Lytinis dimorfizmas ir imprintingas

***CYP* genų valdymas** yra labai sudėtingas. Tai suprantama, nes sprendžiamas klausimas „būti ar nebūti". Sistema saugo organizmą nuo nuodų, todėl, kaip minėta, veikia dubliuojantys apsaugos būdai, tą

patį ksenobiotiką skaido įvairūs fermentai. Patys citochromai P-450 gali atakuoti įvairius substratus, vienas kitą bent iš dalies pakeisti.

***CYP* genų veikla tiriama** naudojant ne tiek mutantus, kiek induktorius ir inhibitorius. Viena mutacija – *CYP2D* geno yra labai paplitusi: 5–10% žmonių turi šio geno mutaciją. Ji buvo aptikta tiriant vieno anksčiau vartoto vaisto, mažinančio kraujospūdį – **debrisochino** (izochinolino karboksiamido) žalingas pašalines pasekmes.

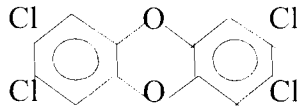
Tai, kad *CYP* genai pasireiškia ne visose ląstelėse, audiniuose, organuose, yra įprasta eukariotų genų valdymo ypatybė. Aktyviausiai *CYP* genai veikia kepenyse, plaučiuose, placentoje ir smegenyse. Tačiau jų ypatybė yra ta, kad vienuose organuose jie gali būti konstitutyvūs, kituose – indukuojami kaip *CYP2B* pošeimio genai. Plaučiuose jie yra konstitutyvūs, kepenyse – indukuojami. Ksenobiotikų metabolizmui specializuotame organe – kepenyse dauguma citochromų P-450 genų yra indukuojami.

Induktoriai yra įvairūs, kaip ir pati sistema. Dažniausiai tai specifiniai substratai, kuriuos atakuoja atitinkami citochromai P-450.

Genotoksikologijoje susmulkinta endoplazminio tinklo frakcija (mikrosomos, arba S-9) buvo pritaikyta promutagenams nustatyti. Tai tokie mutagenai, kurie veikia ne tiesiogiai, o po ksenobiotiko metabolizmo I fazės. Prireikė surasti tokius induktorius, kurie indukuotų kuo daugiau citochromų P-450, t. y. ieškota universalių induktorių. Įsitikinta, kad dažniausiai induktorius yra pats substratas. Vis dėlto surasti du induktoriai, kurie aktyvina dideles *CYP* genų grupes. Tai 3-metilcholantrenas ir fenobarbitalis.

„MC tipas“. 3-metilcholantrenas indukuoja *CYP1A* genus, kurių koduojami citochromai P-450 atakuoja svarbią kancerogenų grupę – policiklinius arenus. Jų mRNR kiekis padidėja apie 100 kartų.

Visi panašūs induktoriai ir jų indukuojami *CYP* vadinami MC tipo induktoriais. Stiprūs MC induktoriai yra polichloruoti bifenilai – labai svarbi ksenobiotikų grupė, kaip induktoriai dažnai vartojami herbicidai. Labai stiprus induktorius yra herbicidas „Aroclor 1254“, bet visus lenkia (tiesiog visus tyrinėtojus šokiravo) 2, 3, 7, 8-tetrachlordibenz-[b,e]-1,4-**dioksinas**:



Jis net apie 3000 kartų veiksmingesnis už 3-metilcholantreną. Be to, genų veiklą sukelia itin mažos jo dozės, faktiškai pėdsakai ($0{,}85 \cdot 10^{-9}$ mol/kg).

Būtent dioksinas buvo tas pavojingas nuodas „oranžiniame“ defoliante, kurį vartojo Vietname JAV karinės pajėgos. Defoliante jis atsirado dėl aukštos temperatūros (gaisrų). Dar vienas skandalas kilo Taivane – „aliejaus liga“. 1979 m. apie 2000 Taivano gyventojų, vartojusių aliejų ryžiams kepinti, susirgo šia liga (atsiranda būdinga odos ir nagų pigmentacija, pūslės). Pasirodo, aliejuje būta herbicidų – polichloruotų bifenilų pėdsakų. Temperatūros veikiami (kepant) šie virto dioksinu.

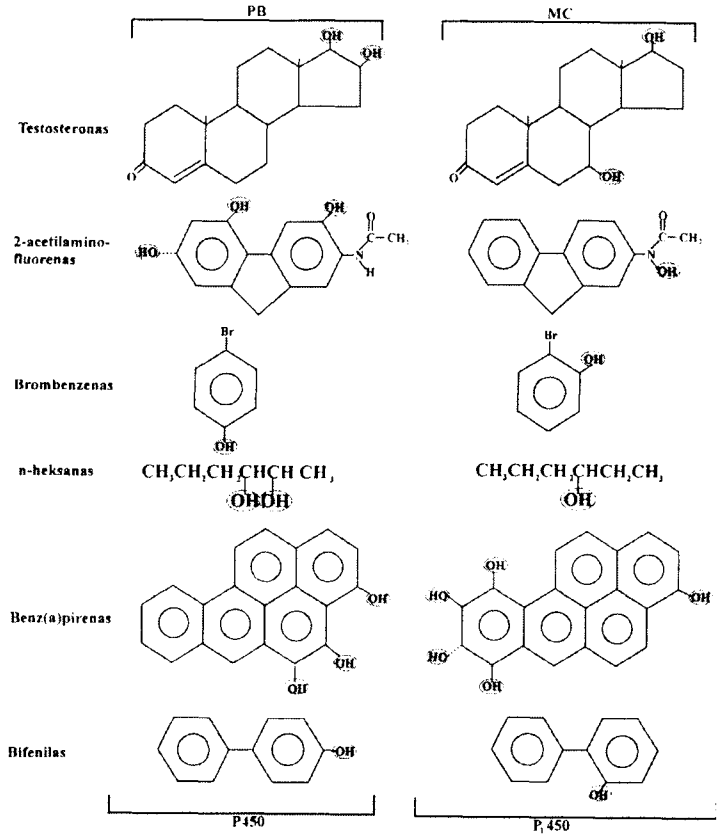
Polichloruoti bifenilai kaip herbicidai naudojami ir Lietuvoje varpučiui naikinti.

PB tipas – kito induktoriaus fenobarbitalio (sin. 5-etil-5-fenilbarbitūro rūgštis, luminalis). Jis indukuoja kitus *CYP*, tarp jų *CYP2B* ir *CYP2C* pošeimių. Polichloruotų bifenilų mišinys herbicidas „Aroclor-1254“, taip pat ir dioksinas, indukuoja MC ir PB tipus. Priklausomai nuo induktoriaus, pvz., MC ar PB, pasigamina netapatūs to paties junginio (ksenobiotiko) metabolitai (4.11 pav.).

***Ah* lokusas. Baltymai – receptoriai**. Su kokiu genu sąveikauja MC tipo induktoriai, paaiškėjo tik po to, kai pavyko aptikti pelių liniją (DBA/2N), kuri nereaguoja į šiuos induktorius. Šis dominuojantis genas buvo pavadintas *Ah* (yra dvi jo pavadinimo kilmės versijos, istorinė – angl. *arylhydroxylase* – pagal pagrindinį indukuojamų baltymų fermentinį aktyvumą, ir antra, šiuolaikinė – *aromatic hydrocarbon responsiveness* – pagal pagrindinę grupę ksenobiotikų, kurių oksidaciją vykdo jo valdoma genų grupė regulonas). *Ah* lokusas valdo apie 20 genų, t. y. per 10 monooksigenazinių aktyvumų.

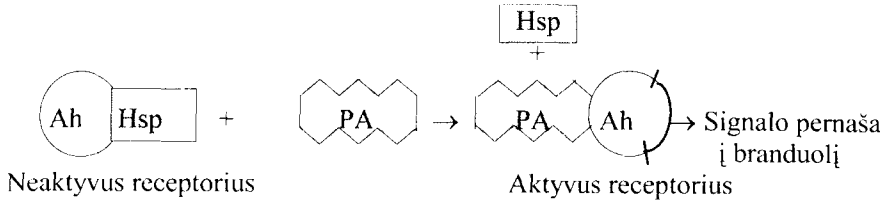
Visi genai, valdomi vieno bendro valdymo geno, sudaro **reguloną.** Visi regulono genai turi tokias pačias valdymui skirtas nukleotidų sekas, su kuriomis sąveikauja vieno bendro valdymo geno produktai – reguliavimo baltymai.

Ah lokusas – tik ledkalnio viršūnė. Kaip ir daugelio genų, kurių veikla yra atsakas į ekologinių veiksnių poveikį, pvz., padidėjusį policiklinių arenų (PA) kiekį, tradiciškai signalą priima ląstelės paviršiuje receptorius; toliau pernešamas į branduolį, o ten transkripcijos veiksnys įjungia genus/visą reguloną ar genų sankaupą. Tai būdinga valdymo eiga. Tačiau *CYP* genų ji vyksta truputį kitaip.



4.11 pav. **Ksenobiotikų metabolizmo skirtumai priklausomai nuo PB arba MC indukuojamų citochromų P-450 izoformų:**
kairėje – citochromo P-450 izoformos, indukuotos fenobarbitaliu (PB); dešinėje – indukuotos metilcholantrenu (MC); citochromai P-450 įterpia O atomą šalia H atomo ir susidaro OH grupė, pažymėta pilkai (remiantis O. Pelkonen et al., 1978)

Ah lokusas kaip tik ir koduoja receptorių, be kurio ląstelės nereaguotų į PA. tačiau receptorius yra ne ant membranos, o netoli jos – citoplazmoje. Be to, ten jis neaktyvus, susijungęs su vienu svarbiausių šiluminio atsako baltymų – Hsp70 (4.12 pav.). Todėl bus reaguojama tik tada, kai PA (ar atitinkamai kitas ksenobiotikas) prasiskverbs į ląstelę. Ah receptorius būna tol neaktyvus, kol į ląstelę neprasiskverbia PA. Prasiskverbęs PA sąveikauja su Ah receptoriumi, ir šis išsilaisvina iš komplekso „Ah +Hsp“, aktyvinasi ir perneša į branduolį signalą apie pavojų:

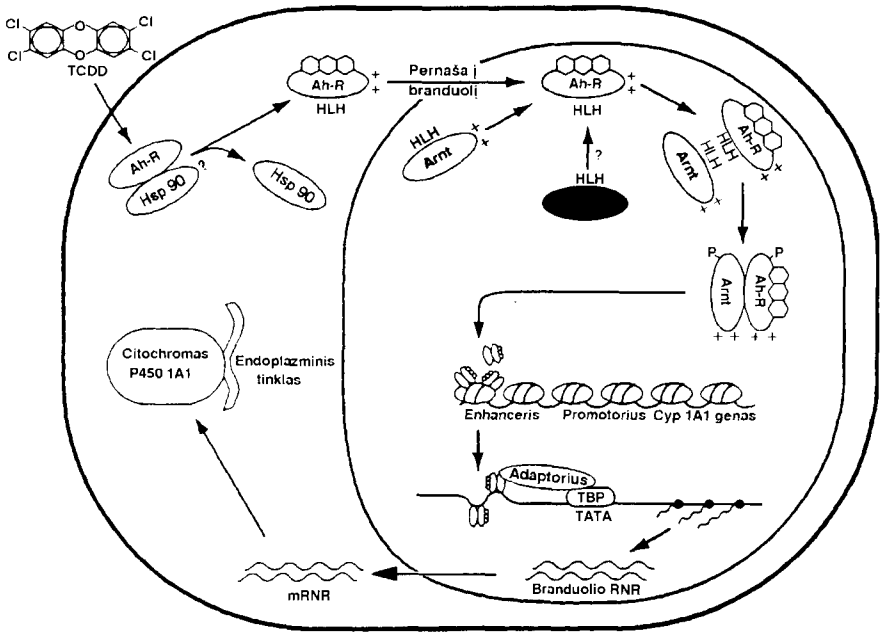


Tai labai panašu į represoriaus ir induktoriaus sąveiką *lac* operone.

Steroidinių hormonų receptorius irgi jungiasi su tuo pačiu šiluminio šoko baltymu, kaip ir Ah receptorius. Matyt, toks valdymas būdingas *CYP* genams.

***Ah* aleliai.** *Ah* genas, kaip ir daugelis kitų eukariotų genų, yra polimorfinis, turi daug alelių. Kaip valdymo genai, jie skirtingo stiprumo. Įvairūs *Ah* lokuso alelių dariniai (pvz., Ah^bAh^b, Ah^bAh^d, Ah^dAh^d ir kt.) lemia individualius žmonių skirtumus.

Valdymo genai gali lemti ir kiekybinius individų skirtumus.



4.12 pav. **Citochromo P-450 *CYP1A1* geno indukcija 2,3,7,8-tetrachlordibenz-[b, e]--dioksinu (TCDD)**

Ah regulono valdymo kelias yra tipiškas eukariotų genų, kurie lemia atsaką į ekologinius veiksnius:

induktoriaus sąveika su receptoriumi → signalo pernaša į branduolį → sąveika su transkripcijos veiksniu → transkripcijos veiksnio sąveika su valdomais genais → genų veiklos aktyvacija – mRNR transkripcija → transkripto brendimas ir pernaša į ribosomas → transliacija – baltymo sintezė → baltymo brendimas ir veikla.

Tai ilgas kelias. Taip galima ir „kojas pakratyti". Į pavojingus gyvybei aplinkos veiksnius turi būti greitesnis ir **itin greitas atsakas** – „greitojo reagavimo" tipai. Labai didele sėkme galima laikyti tai, kad pavyko aptikti žiurkių subliniją, kurios kepenyse yra neveikli citochromo P-450 IIC13 izoforma. Ši izoforma oksiduoja testosteroną. Pats *CYP2C13* genas mutantinės žiurkių linijos kepenyse transkribuojamas normaliai. Mutantinio ir normalaus žiurkių *CYP2C13* geno mRNR kiekis maždaug vienodas, o citochromas nesintetinamas. Taip ir paaiškėjo, kad yra atsarginės, neaktyvios mRNR. Jas aktyvina ksenobiotikas, o šiuo atveju endogeninės medžiagos testosterono perteklius. Dėl atsarginių mRNR atsako kelias labai sutrumpėja: tereikia aktyvinti mRNR, ir jau sintetinamas baltymas.

Dar greitesnis, pats greičiausias atsakas, kai citoplazmoje jau yra baltymai, tik jie neveiklūs. Ir toks valdymo būdas taip pat aptiktas citochromų P-450. Baltymai sintetinami ir pervedami į neaktyvią būseną – citochromai P-450 fosforilinami:

citochromas P-450 $\xrightarrow[\text{Proteinkinazė}]{\text{Fosforilinimas}}$ **citochromas P-420**

aktyvus baltymas $\xleftarrow[\text{Fosfatazė}]{\text{Defosforilinimas}}$ **neaktyvus baltymas**

Fosforilintas citochromas P-420 (dėl pasikeitusio šviesos sugėrimo maksimumo – 420 nm) yra neaktyvus tol, kol fosfatazės pašalins fosfato rūgšties liekaną. Tai labai dažnas greito atsako būdas.

CYP genų valdymo išskirtiniai reiškiniai du: lytinis dimorfizmas ir genų veiklos imprintingas.

Lytinis dimorfizmas – tai skirtumai tarp lyčių pagal citochromų P-450 izoformas. Daugiau veikliųjų *CYP* genų turi vyrai (pvz., *CYP1A*, kuris lemia benz(a)pireno ir kitų PA metabolizmą). Tai genai, kurių veiklą valdo lytiniai hormonai. Hormonų poveikis *CYP* genų veiklai ir daugelis kitų citochromų P-450 genetikos klausimų tiriami graužikų pelių, žiurkių genome. Tai ne vien dėl patogumo. Šiems gyvūnams būdingas itin aktyvus ksenobiotikų metabolizmas: ryja viską, net žiurkių nuodus...

Graužikų genome lytinis dimorfizmas būdingas ir ksenobiotikų degradacijos II fazės reakcijoms. Antai gliukurono rūgštis prie nitrofenolio intensyviau prijungiama žiurkių patinėlių kepenyse, o sulfato liekana, atvirkščiai, patelių kepenyse net penkis kartus intensyviau negu patinėlių kepenyse.

***CYP* genų veiklą valdo lytiniai ir augimo hormonai.** Būtent dėl augimo hormonų daug *CYP* genų veiklūs tik subrendusių žinduolių organizme. Abiejų hormonų grupių veikla suderinta. Antai *CYP2A2*, *CYP2C11*, *CYP2C13* genų ekspresija vyksta tik subrendusių patinėlių kepenų ląstelėse. Subrendusių patelių ląstelėse šie genai neaktyvūs. Įtakos turi amžius, objektas. Žmogaus izoformos IIIA genas nepriklauso nuo lyties, o žiurkės veikia tik subrendusiuose patinėliuose.

CYP genų valdymas hormonais turi gilią ekologinę-biologinę prasmę – išsaugoti rūšį ir jos genofondą:

– **vaikams visa, kas geriausia!** Saugomas bręstančių palikuonių organizmas nuo mutageninių veiksnių.

***CYP* genų veiklos imprintingas**. Tai dar viena *CYP* genų ypatybė, irgi nustatyta graužikams. **Imprintingas, arba ląstelės atmintis**, dažniausiai būdingas genams, kurių veiklą reguliuoja hormonai.

Imprintingu šis reiškinys buvo pavadintas dėl labai didelio panašumo į imprintingą psichologijoje. Paveikus naujagimį ksenobiotiku, kurį metobolizuojančio citochromo P-450 genai veikia tik subrendusio gyvūno kepenyse, poveikis, pvz., benz(a)pirenu, etilmorfinu, etoksikumarinu įsidėmimas. Pakartotinai jau subrendusiam gyvūnėliui davus kurios iš šių medžiagų, atitinkamų genų indukcija buvo spartesnė negu tų gyvuliukų, kurie kontakto su ksenobiotikais prieš tai neturėjo.

Prisiminkime, kad panaši atmintis būdinga ir B limfocitams.

4.5. GENŲ VEIKLOS VALDYMAS

4.5.1. Cis- ir trans-veiksniai. Regulonas

Eukariotų ir prokariotų genų veiklos valdymas iš esmės skiriasi kad ir tuo, jog

- eukariotų genų veiklai ypatingą reikšmę turi chromatino sandara,
- daugelis genų nesudaro sankaupų, yra išsibarstę po genomą (chromosomas),
- daugialąsčių organizmų genų veikla yra suderinta skirtingose ląstelėse; vienų ląstelių produktai reguliuoja kitų ląstelių veiklą.

Jau esame išnagrinėję keletą itin svarbių eukariotų genų grupių:

- baltymų sintezės/ribosominių RNR,
- chromatino sandaros/histonų,
- O_2/CO_2 apykaitos/hemoglobinų,
- atsparumo infekcijai/imuninio atsako (Ig, TCR, MHC),
- atsparumo ksenobiotikams, jų biodegradacijos/citochromų P-450,

taigi galėjome įsitikinti, kad genų **valdymo pobūdis** – ar šie genai sutelkti į sankaupas, ar išsibarstę po chromosomas, kokia jų valdymo tvarka, – yra tikslingas, **tenkina optimalias šių genų veiklos sąlygas**. Tai, kad eukariotų genome vyrauja regulonas, irgi tenkina šių genų veiklos optimalias sąlygas:

- daugelis eukariotų genų dalyvauja daugiau kaip vienoje genų valdymo grupių, sankaupas sudaro tik labai ribotos veiklos genai;
- išsibarstymas po genomą atitinka optimalias saugos sąlygas: vieno geno delecija neslopina visų likusiųjų regulono genų veiklos.

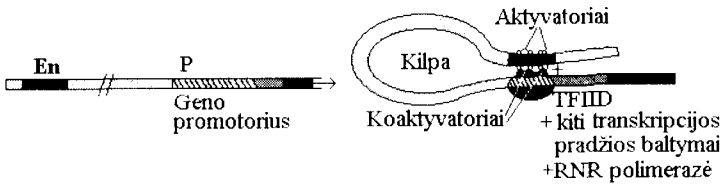
Bet ir šių genų veiklos valdymo pamatą sudaro Žakobo ir Mono atrasti veiksniai – aktyvatorius, represorius, induktorius, specialios nukleotidų sekos (cAMP receptoriaus ir represoriaus pažinimo, operatoriaus), valdymo genai (I) ir valdymo būdas.

***Cis*-veiksniai** yra nukleotidų sekos, kurios valdomos/koduojančios geno dalies atžvilgiu yra *cis*-padėtyje (t. y. toje pačioje chromosomoje). Prie jų jungiasi valdymo genų produktai.

Konkrečiai *lac* operone – tai sekos, prie kurių jungiasi cAMP receptorius, represorius ir RNR polimerazė. Kiek vėliau šios sekos pasipildė sekomis, kurios buvo pavadintos enhanceriais (angl. *enhance* – didinti, stiprinti). Jie žymimi En.

Enhanceriai yra geno veiklą aktyvinančios nukleotidų sekos, kurios dideliu atstumu nutolusios nuo valdomojo geno, bet paprastai yra cis-padėtyje, t. y. toje pačioje chromosomoje, kaip ir valdomasis genas.

Atstumas tarp enhancerio (iki kelių dešimčių kb) ir valdomo geno gali tik atrodyti labai didelis, bet paprastai susidaro kilpa, ir enhanceris priartėja prie promotoriaus:



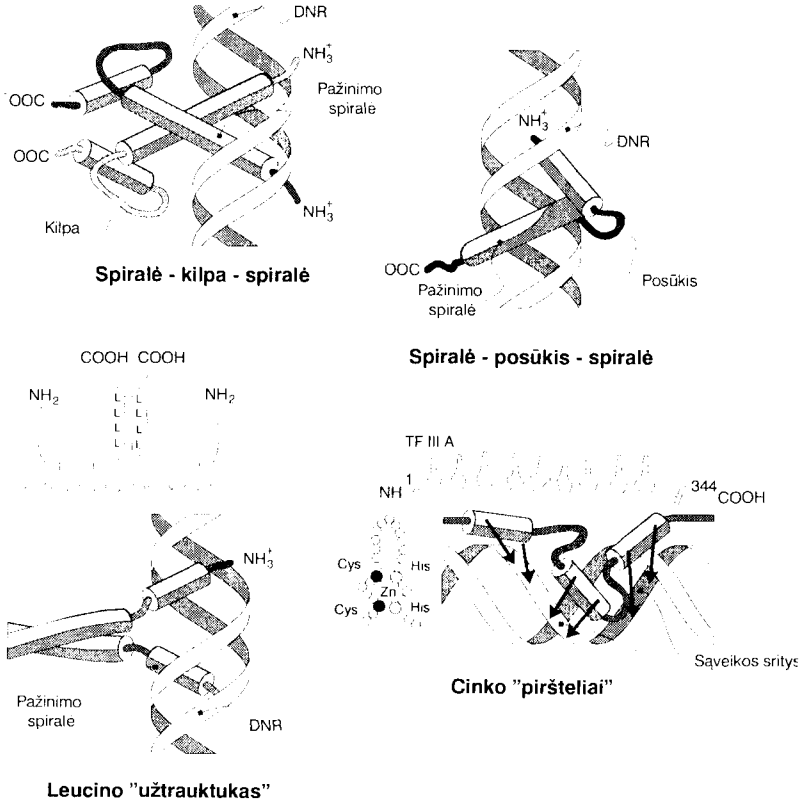
Taigi priartėjęs enhanceris sudaro kompleksą su promotoriumi:

- arba sąveikauja su RNR polimeraze ir kitais transkripcijos pradžios baltymais,
- arba su transkripcijos veiksniais.

Enhanceriai gali būti iš abiejų (5′- arba 3′-) geno pusių. Jų aptikta netgi intronuose.

Trans-veiksniai yra kita genų valdymui būtinų veiksnių grupė. Tai baltymai – valdymo genų produktai. Jie gali skatinti arba slopinti geno arba genų grupės veiklą. Šie veiksniai kitaip dar vadinami **transkripcijos veiksniais**. Jie yra trijų tipų.

1. Pagrindiniai (baziniai), arba bendrieji, transkripcijos veiksniai (žymimi **TF**) įeina į kompleksą baltymų, kurie būtini geno transkripcijai. Jie gali nulemti labai didelių genų grupių veiklą. Antai mažiausias transkripcijos veiksnių TFIID, TFIIB, TFIIF kompleksas su



4.13 pav. **Įvairūs transkripcijos veiksniai ir jų sąveikos su DNR modeliai:** L – leucinas

RNR II polimeraze aktyvina visus genus, kurie lemia baltymus ir kuriuos transkribuoja RNR II polimerazė (žr. p. 88). Vienas kitas papildomas transkripcijos veiksnys gali sąlygoti mažesnės, specifiškesnės genų grupės, pvz., konstitutyvių, adaptacinių arba audinių specifinių genų ir kt. aktyvaciją.

Vienas iš šių veiksnių TFIID kartu su TATA nukleotidų seką atpažįstančiu TBP baltymu (angl. *TATA binding protein*, žr. p. 92) sudaro kilpą tarp enhancerio ir promotoriaus. Kai susidaro kompleksas su enhanceriu, genas transkribuojamas aktyviau negu be enhancerio.

2. Specifiniai transkripcijos veiksniai, saviti konkrečiai genų grupei – regulonui. Transkripcijos veiksniai pagal jungimosi su DNR pobūdį yra kelių tipų (4.13 pav.):

- **spiralė–posūkis–spiralė** (HTH, angl. *helix–turn–helix*), įsistato į didįjį griovelį (Lac ir Trp represoriai, λ represorius, homeodomenas, kurį koduoja homeoziniai genai);
- **cinko „pirštelių" motyvas** pradžioje aptiktas transkripcijos veiksnio TFIIIA, kuris valdo *5S rRNR* geno transkripciją. Varlės *Xenopus* šis veiksnys turi 9 cinko „pirštelius" (Cis arba His liekana jungiasi su Zn^{2+}); motyvą turi ir steroidinių hormonų receptoriai;
- **leucino „užtrauktuko" motyvas** iš dviejų polipeptidų. Kiekviename jų reguliariai išsidėsčiusios Leu liekanos (c-Myc, c-Fos),
- **spiralė–kilpa–spiralė** (HLH, angl. *helix–loop–helix*) – vieną spiralę kilpa jungia su kita, polipeptidai gali būti tie patys arba skirtingi (paramutageniškų kukurūzų genų koduojami baltymai).

Kai tik nustatoma, kad baltymas turi kurią nors iš minėtų sandarų, tai beveik automatiškai tampa įrodymu, kad šį baltymą koduojantis genas yra valdymo, o pats baltymas yra transkripcijos veiksnys.

3. Koaktyvatoriai ir korepresoriai; jie jungiasi ne tiesiogiai prie DNR sekų, o prie valdymo baltymų.

Regulonas. Tai po genomą išsibarsčiusių genų grupė, vienijama bendros funkcijos ir bendrų valdymo genų. Visi regulono genai turi tokias pačias valdymui skirtas nukleotidų sekas (4.1 lentelė).

Gana dažnai tas pats eukariotų genas priklauso ne vienam regulonui arba klauso kelių „viršininkų" komandų kylančia tvarka. Gali būti **valdymo genų hierarchija.** Tokia valdymo genų hierarchija ypač būdinga morfogenezės – individualios raidos genams. Pavyzdžiu gali būti drozofilos kūno segmentacijos genai (žr. p. 374).

4.1 lentelė. **Mielių aminorūgščių bado ir drozofilos šiluminio šoko regulonų palyginimas**

Organizmas	Genas	Indukcija	Bendra valdymo seka (cis-veiksnys)	Sekos homologija %	Padėtis gene
Mielės	*HIS 1*	Aminorūgščių badu	Kartotinė seka A $\frac{A}{T}$GTGACTC	89	–334–319
					–170–73
	HIS 3			78	–99–33
	HIS 4			89	–195–183
					–139–88
	TRP 5			78	–190–65
Drozofila	*hsp 70*	Šiluminiu šoku	Kartotinė seka CTCGAATGTTC--GCGA	85	–62
	hsp 83			85	–62
	hsp 26			54	–68
	hsp 27			69	–61
	hsp 68			62	–75
	hsp 23			85	–147
	hsp 22			85	–147

Signalų pernaša. Paviršiniai receptoriai ir šaperonai. Gana dažnai signalas veikti arba nustoti veikti yra ne ląstelės viduje, o iš šalies. Tai būdinga ir šiluminio šoko genams. Signalas veikti yra membranos baltymų irimas, kurį sukelia aukštesnė temperatūra. Pūslelės (vezikulės) šį signalą nuo ląstelės membranos gabena į branduolį. Ten aktyvinamas valdymo genas, kuris koduoja transkripcijos veiksnį, o šis aktyvina visus regulono genus.

Valdymo įvairovė prasideda nuo receptoriaus. Vieni receptoriai yra ląstelės membranoje. Jie sąveikauja tik su induktoriumi, o toliau signalas pernešamas į branduolį. Ten aktyvinamas baltymas (arba baltymų kompleksas), kuris yra transkripcijos veiksnys. Vadinasi, nuo signalo priėmimo iki komandos genams veikti yra ištisa tarpinė grandis:

- **receptorius → pernašos struktūros ir veiksniai → transkripcijos veiksnys.**

Taip veikia, pvz., mitogenai (žr. toliau), t. y. veiksniai, kurie sukelia ląstelių dalijimąsi.

Signalo pernašos genetika labai sudėtinga. Ji šiuo metu labai smarkiai tiriama. Tiriant signalo pernašą, atrasta nauja grupė genų. Jie koduoja baltymus arba RNR (žr. V sk.), kurių paskirtis pernešti ir/ar pastatyti į vietą genų produktus (baltymus ir RNR). Šių „tiekimui ir statybai skirtų" genų labai daug, daugiau negu tikėtasi. Pirmieji buvo ištirti šiluminio šoko atsako genai ir jų veikla. Poveikis (netgi trumpalaikis) aukšta temperatūra sukelia didelio genų skaičiaus veiklą. Paaiškėjo, kad ne visų jų produktai tiesiogiai dalyvauja likviduojant aukštos temperatūros poveikio pasekmes. Pirminis signalas yra apirę baltymai. Baltymo klatrino padengtomis vezikulėmis (pūslelėmis) signalas pernešamas į branduolį. 1987 m. Elis (J. Ellis) atrado šaperonus.

Šaperonai – baltymai, kurių paskirtis padėti kitiems baltymams sukurti tretinę sandarą įvairiose ląstelės struktūrose ir baltymų kompleksuose. Patys šaperonai į šių struktūrų-kompleksų sudėtį neįeina.

Drozofilos šiluminio šoko atsako genai *hsp 70* ir *hsp 60* (nuo *heat-shock protein*) koduoja šaperonus, kurie vėliau buvo aptikti ir kituose organizmuose: bakterijose, įvairiuose eukariotuose. Vadinasi, jie yra labai konservatyvūs. Šaperonai yra ir baltymai **nukleoplazminai**. Jie veikia branduolyje: tvarko DNR replikaciją, transkripciją, RNR brendimą, molekulių pernašą į branduolį ir iš jo.

Hormonai – didelių genų grupių reguliatoriai. Tai ypatingi genų veiklos reguliatoriai: jie gaminasi vienose ląstelėse (paprastai specialiose, liaukų), o valdo genų veiklą kitose ląstelėse. Dažniausiai tik tam tikrose, kurios turi atitinkamą baltymą-receptorių.

Hormonų, receptorių, pernašos baltymų, šaperonų genų mutacijos gali atsiliepti tiems vyksmams ir reiškiniams, kuriuose dalyvauja jų koduojami baltymai. Pavyzdžiu vėl gali būti steroidiniai hormonai. Pasitaiko moterų, kurių kariotipas yra XY. Normaliai lyties raidai būtinai reikalingi ir steroidinis hormonas testosteronas, ir receptorius.

Testikulinė feminizacija būdinga XY kariotipo moterims, kurių organizme nesigamina receptorius.

Jų ląstelės negali reaguoti į testosteroną, todėl nesivysto vyriška lytis (žr. p. 391). Testikulinė feminizacija dažnesnė tarp manekenių. Jų fenotipas atitinka šiuolaikinę moters grožio sampratą ir tuos reikalavimus, pagal kuriuos atrenkamos merginos šiai profesijai.

4.5.2. Genų veiklos valdymo etapai (apžvalga)

4.5.2.1. Genomo sandara ir genų veiklos valdymas

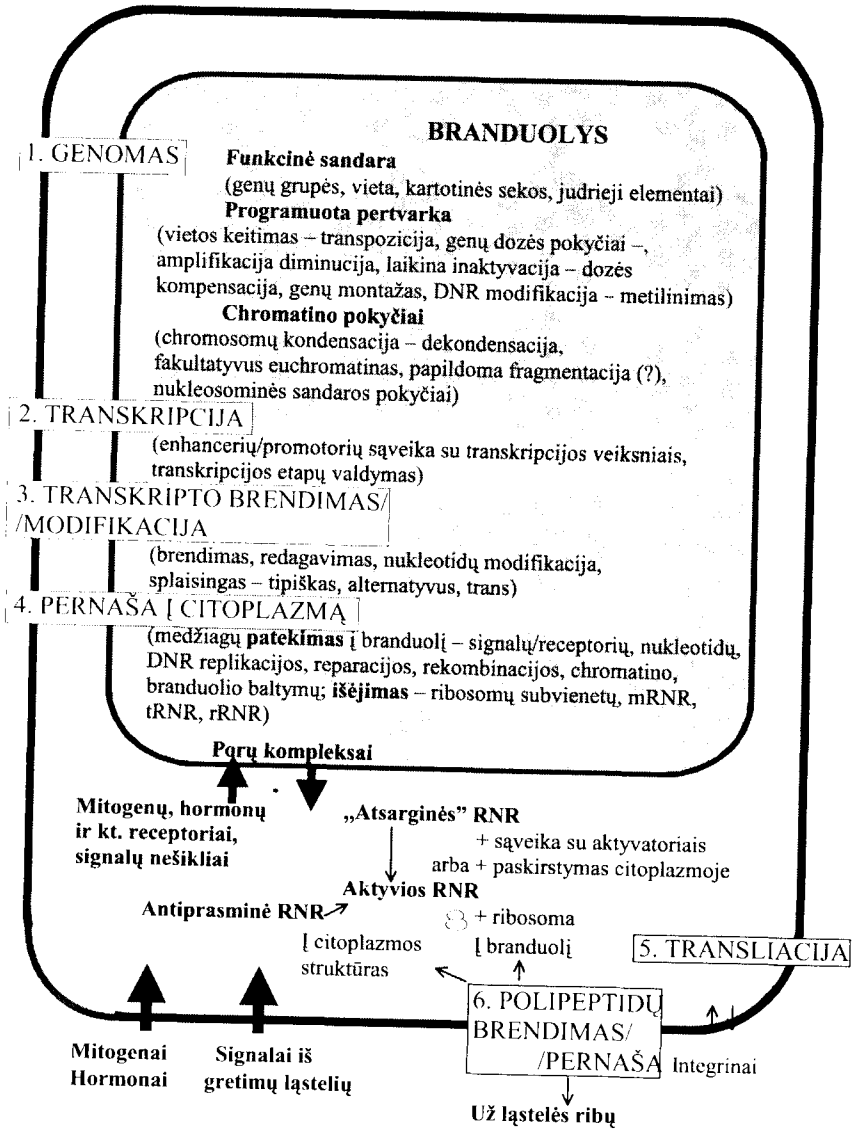
Genų valdymo lygiai. Skiriami šeši genų veiklos (ekspresijos) valdymo lygiai/etapai: 1) genomo (stacionarus ir pertvarkos), 2) transkripcijos, 3) RNR brendimo ir modifikacijos, 4) pernašos į citoplazmą (aktyvių arba „atsarginių" mRNR pavidalo), 5) transliacijos, 6) polipeptidų brendimo ir pernašos (4.14 pav.).

II–IV skyriuose pateiktų žinių apibendrinimas. Buvo galima įsitikinti, kad genų veikla, didesnis ar mažesnis konkrečių genų aktyvumas, valdymo pobūdis priklauso nuo genomo ir genų sandaros.

Genomo sandara ir genų aktyvumas. Pirmiausia geno aktyvumas priklauso nuo **jo padėties genome**, t. y. nuo:

- **jungimosi į genų grupes,**
- **padėties heterochromatino atžvilgiu,**
- **genų dozės: ar yra kartotinių genų sankaupos, ar genai unikalūs,**
- **padėties kitų genų atžvilgiu,** ypač genų sankaupose.

21. 1313



4.14 pav. **Eukariotų genų veiklos valdymo etapai/lygiai**

Aktyvesni genai yra arčiau sankaupos valdymo (cis-veikiančių) sekų. (Prisiminkime *lac* operono poliškumą.). Valdymo sekos yra cis-padėtyje. Tik pastaruoju metu aptiktos sekos, kurios gali keisti ir valdyti geno veiklą būdamos trans-padėtyje, t. y. kitoje homologinėje

chromosomoje. Tai aptinkama heterozigotose. Šis reiškinys pavadintas **transvekcija**. Skirtingai nuo alelinių genų kitokių sąveikų, transvekcija pasireiškia tik tada, kai homologinės chromosomos yra konjugavusios. Kai vienoje iš homologinių drozofilos chromosomų yra defektyvus genas, nereaguojantis į hormoną ekdizoną (turėtų susidaryti pūpsnys), šį kai kurių mutantinių genų defektą „ištaiso" kitoje homologinėje chromosomoje esantis genas, ir pūpsnys susidaro ir toje mutantinėje chromosomoje. Gali būti, kad nuo šio reiškinio priklauso prionų susidarymas, normalaus p^{+53} baltymo virsmas mutantiniu baltymu p^{+53} (žr. toliau) ir kt.

Neseniai nustatyta, kad homologinės chromosomos arba jų dalys yra konjugavusios ir somatinėse ląstelėse, todėl gali būti, kad transvekcija yra dažnesnė negu šiuo metu manoma.

Genų padėties pokyčiai pasireiškia kaip padėties efektas. Genų veiklai valdyti ypač svarbus **variabilusis padėties efektas**, t. y. chromosomos segmento translokacija šalia heterochromatino (žr. toliau) arba euchromatino virsmas heterochromatinu.

Genomo sandaroje yra užprogramuotos dinaminės jo ypatybės:

- **pertvarka** keičiantis geno veiklai ir net genų sandarai (*Ig, TCR* genų),
- **funkciniai chromatino pokyčiai** ląstelei dalijantis ir somatinėse ląstelėse, dėl kurių kinta genų veikla.

Drozofilos genome aptiktas pirmasis genas, kuris valdo vieną iš genomo pertvarkos būdų – amplifikaciją. Tai *ocelliless*. Šio geno inversija arba translokacija keičia genų amplifikaciją. Amplifikuojami ne tie genai, kurių amplifikacija paprastai vyksta, t. y. užprogramuota iš anksto, o nauji genai, kurie atsiduria šalia *ocelliless* dėl inversijos ar translokacijos.

Pūvančiuose lapuose, žievėje gyvenančių uodelių *Sciarida* (pvz., *Rhynoscaria* ir kt.) chromosomose dėl amplifikacijos susidaro **DNR pūpsniai**. Išoriškai jie labai panašūs į politeninių chromosomų pūpsnius, bet tarp jų yra esminis skirtumas. Politeninių chromosomų pūpsniai sudaryti ne iš amplifikuotos, o iš dekondensuotos DNR. Po amplifikacijos genai išlieka tie patys, keičiasi tik jų dozė.

Dalies genomo pernešimas į kitą vietą. Šis įvykis sukelia minėtąjį reiškinį padėties efektą. Genomo segmentų pernaša iš vienos vietos į kitą gali vykti dėl:

- judriųjų genomo elementų, kuriuos turi visos organizmų grupės;
- translokacijos į telomerinius galus, kaip *Trypanosoma VSG* genų (taip prisitaikoma prie šeimininko ląstelės paviršinių baltymų);
- translokacijos į specialius lokusus, kaip *HMLα* arba *HMLa* lokusų/kasečių į specialų lokusą *MAT* (tai lemia mielių poravimosi tipus);
- lokuso inversijos (apsisukimas 180°); taip vyksta *Salmonella* fazių kaita (žiuželių tipai);
- insercijos dėl plazmidžių, kaip T-DNR iš Ti plazmidės augaluose.

Kol kas aptiktas tik imuninio atsako *Ig* ir *TCR* genų montažas.

Stabilūs epigenetiniai genomo pokyčiai somatinėse ląstelėse. Tai pirmiausia nustatyta branduolių persodinimais iš diferencijuotų ląstelių į ovocitus. Vėliau *Paramecium* aptikti **epigenai** – tai nuo geno nukopijuotos RNR, kurios citoplazmoje įgyja genetinį savarankiškumą, dauginasi ir netgi perduodamos nelytinėms kartoms. Taip keičiasi *Paramecium* lytiniai tipai ir serotipai. Panašiu būdu susidaro prionai, kurie aptikti mielių ir žinduolių ląstelėse.

Viena iš epigenetinių pokyčių priežasčių – lokalinis **specifinis konkrečių genų metilinimas**, arba, atvirkščiai, demetilinimas. Kadangi metilinimas dažniausiai slopina genų veiklą, tai aktyvūs lokusai demetilinami. Antai B limfocituose demetilinami *Ig* genai, o α-aktino genas demetilinamas mioblastuose, insulino genas – insuliną gaminančiose ląstelėse ir pan.

Stabilūs epigenetiniai pokyčiai generatyvinėse ląstelėse, paramutacijos irgi siejami su DNR metilinimu, kaip ir genomo imprintingas, kuris irgi vyksta generatyvinėse ląstelėse ir persiduoda palikuonims.

4.5.2.2. Chromatino sandara ir genų veiklos valdymas

Pagrindinė eukariotų chromatino dalis yra neveikli. Tik nedidelė genomo dalis yra aktyvi, transkribuojama. Taip yra dėl histonų poveikio ir chromatino sandaros.

Histonai visiškai nuslopina transkripciją. Tik atradus šią jų savybę, manyta, kad nustatytas būdas, kaip valdoma genų veikla. Manyta, kad kiekvienas genas ar jų grupė turėtų turėti po savitą histoną ar jų formą. Tačiau paaiškėjo, kad histonų tipų yra nedaug. Įvairiausi yra histonai H1. Tačiau įvairios jo formos nulemia ne tiek konkrečių genų, kiek viso ląstelės genomo veiklos pokyčius, todėl H1 formos svarbios ląstelių diferenciacijai. Antai paukščių eritrocituose vietoj histono H1 yra histonas H5.

Kur kas svarbiau tai, kad slopinantis histonų poveikis susilpnėja šiems jungiantis į kompleksus su rūgščiaisiais baltymais. Tokie yra visi su DNR sąveikaujantys baltymai (RNR polimerazės, transkripcijos veiksniai ir kt.).

Histonai yra šarminiai baltymai, ir su šia savybe siejamas jų slopinantis poveikis. Spermatozoiduose, kurių genomas yra visiškai nuslopinamas, histonus keičia dar šarmingesni baltymai **protaminai**.

Histonai įvairiais būdais **modifikuojami**. Žinomos penkios histonų modifikacijos: 1) acetilinimas, 2) fosoforilinimas, 3) metilinimas, 4) ADP-ribozilinimas (vykstant DNR reparacijai), 5) H2B ir H2A gali jungtis su baltymu **ubikvitinu,** kuris yra proteolitinis fermentas. Tik acetilinimas ir fosforilinimas tiesiogiai siejami su genų veiklos valdymu: jie būdingi aktyviajam chromatinui, nes keičia histonų krūvį ir chromatino kondensaciją.

Transkripcijos veiksniai arba patys yra histonų acetiltransferazės, arba sudaro kompleksą su histonų acetiltransferazėmis. Aktyvus chromatinas yra dekondensuotas, o neaktyvus, atvirkščiai, kondensuotas.

Chromatino kondensacijos pokyčiai gali vykti visame ląstelės genome (pvz., ląstelei dalijantis, spermatozoiduose, politenija – specializuotose ląstelėse, pvz., drozofilos seilių liaukų ląstelėse, chromosomos – „lempų šepečiai“ kai kurių gyvūnų ovocituose), arba pavienėse chromosomose (Baro kūneliu virtusi kondensuota X chromosoma) arba tik atskiruose chromosomos segmentuose. Pavienių genų ir jų grupių veikla priklauso nuo to, kaip valdoma chromatino kondensacija vienoje chromosomoje ir net viename gene. Pasirodo, valdymo sekos ir visa kita geno dalis gali būti nevienodai kondensuota.

Aktyvių ir neaktyvių lokusų chromatino sandara yra skirtinga. Tai įrodyta įvairiais būdais, tarp jų **I DNR nukleaze**. Šis fermentas pasirinktinai skaido aktyvius lokusus. Antai paukščių eritrocitai išsaugo branduolį, kuriame aktyviai transkribuojami (hemo)globinų genai.

I DNR'azė suskaido globinų genus, o ovalbumino genas, kuris yra neaktyvus, neliečiamas.

Tačiau ir aktyvaus lokuso sandara nevienalytė. Tuo pačiu fermentu – I DNR'aze aptikti aktyvių genų 5′ gale ypač **jautrūs nukleazei saitai**. Jų dydis įvairiuose genuose nevienodas, kaip ir atstumas nuo „+1" taško. Dažniausiai tai transkripcijos veiksnių jungimosi vietos.

Chromatino sandaros skirtumai gene atsiranda dėl įvairių priežasčių. Pirmiausia dėl **nukleosomos fazavimo**, t. y. kuriomis nukleotidų sekomis apsivyniojama apie nukleosomos histoninę šerdį, o kuriomis DNR lieka laisva (jungtukas tarp dviejų nukleosomų šerdžių).

Sąveika su baltymais, ypač tais, kurie įsistato į nukleosominę šerdį, irgi keičia chromatino sandarą. Tokie baltymai yra **HMG** (angl. *high mobility group*). Šių baltymų nedidelė molekulinė masė. Jie labai judrūs tiriant juos elektroforezės metodu. Išsilaisvina iš I DNR'azei jautrių vietų. HMG baltymai padeda susidaryti chromatiną aktyvinantiems baltymų kompleksams.

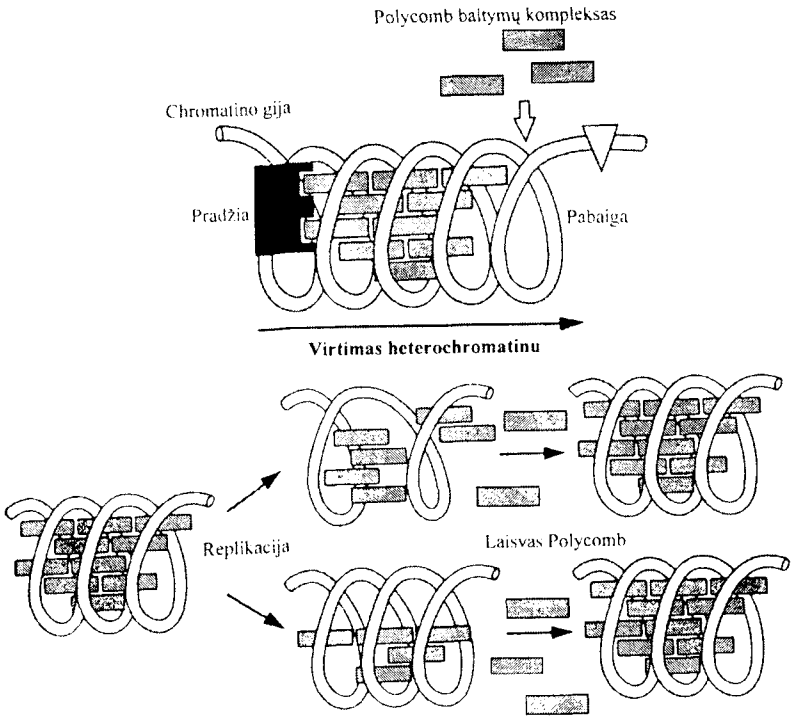
Viso ląstelės chromatino pokyčiai (politenija, „lempų šepečiai") vyksta itin aktyviose ląstelėse. Jose gaminasi dideli genų veiklos produktų kiekiai, dažnai ir „eksportui" už ląstelės ribų (pvz., seilių liaukų ląstelėse).

Chromosomų- „lempų šepečiai" transkripcija išsiskiria ne tik ypatingu intensyvumu, bet ir kitomis ypatybėmis, sunkiai paaiškinamomis vien tik chromosomų dekondensacija: 1) pirminiai transkriptai labai ilgi; 2) transkribuojama ir esanti kilpose, „šepetėliuose", satelitinė DNR, t. y. paprastųjų kartotinių sekų sankaupos.

Chromatino sandara, kondensacija yra genetiškai valdomos. Tai įsitikinta tiriant fakultatyvųjį heterochromatiną/variabilųjį padėties efektą, kai euchromatinas laikinai virsta heterochromatinu, arba atvirkščiai. Tai vienas iš būdų valdyti genų veiklą.

Aptikti genai, slopinantys variabilųjį padėties efektą, – *Su (var)* arba šį efektą skatinantys *En (var)*. Tarp slopinančių genų (trukdo susidaryti heterochromatinui) yra drozofilos ir žinduolių genas *mod* (modulio). Įvykus jo *nul*-mutacijai, vystosi melanomos tipo vėžys.

Polycomb (arba *„HP1/Pc box"* genas), atvirkščiai, sulaiko genus neaktyvioje fakultatyvaus heterochromatino būsenoje (4.15 pav.). Jis valdo apie 150 genų, tarp jų – homeozinius drozofilos genus, lemiančius kūno segmentaciją. Žinduolių genome aptiktas šio geno analogas.



Modelis, kaip išlieka virtimo heterochromatinu pobūdis po DNR replikacijos

4.15 pav. **Polycomb baltymo reikšmė euchromatinui virsti heterochromatinu ir virtimo pobūdžio išlikimas ląstelių kartose (remiantis A. P. Wolffe, 1995)**

4.5.2.3. Genų veiklos valdymas vykstant transkripcijai ir po transkripcijos

Geno sandara tiesiogiai atitinka jo aktyvumą. Tai stebima transkripcijos, transkripto brendimo, pernašos į citoplazmą, transliacijos ir potransliaciniame etape (žr. 4.14 pav.).

Nuo geno sandaros ypatumų priklauso principinės geno, jo produkto savybės:

- ar genas bus tik transkribuojamas, bet netransliuojamas **(galutinis produktas RNR),**
- ar bus transkribuojamas ir transliuojamas **(galutinis produktas baltymas),**
- ar koduojami baltymai liks citoplazmoje laisvi arba įjungti į membranas,

- ar bus pernešami pro ląstelės membraną,
- ar grįš į branduolį (žr. 4.14 pav.).

Ir normaliomis sąlygomis genų aktyvumas įvairus – nuo kelių molekulių koduojamo produkto iki 100 000 ovalbumino mRNR kopijų viščiuko kiaušintakio ląstelėse.

Geno aktyvumą lemia jo nukleosominės chromatino sandaros ypatumai; enhancerio ir promotoriaus sandara, nukleotidų sekos, lemiančios transkripcijos pradžią (kaip greitai susidaro uždaras ir atviras kompleksai, žr. p. 89). Geno sandaroje yra ir nukleotidų sekų, nuo kurių priklauso reiškiniai po transkripcijos: transkripto brendimas ir modifikacija (splaisingas – įprastinis, alternatyvusis, transsplaisingas, nukleotidų modifikacijos, redagavimas, poliA ir kepurės prijungimas), transkripto pernaša į citoplazmą ir veiklos valdymas prieš transliaciją, jos metu ir po jos.

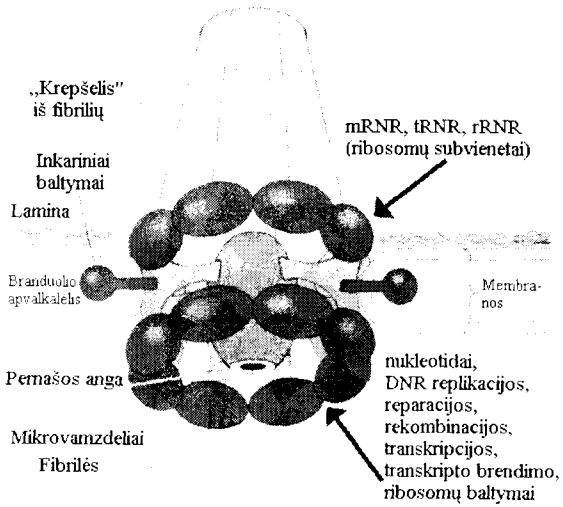
Transkripcijai, transliacijai ir baltymų brendimui valdyti labai svarbi **lyderinė seka**. Kai kurių bakterijų operonų (*trp, his*) lyderinėje sekoje yra seka, vadinama **ateniuatoriumi** (lot. *attenuare* – sumažinti, sušvelninti). Kai yra triptofano ar histidino perteklius, šioje sekoje susidaro papildomas terminatorius, ir transkripcija nutrūksta. Tai akivaizdžiai įrodo, kad ir genų valdymo būdai yra dubliuoti, kad būtų gautas reikalingas valdymo rezultatas: šiuo atveju nutrūktų aminorūgšties sintezė. Nors ir taip jau šią sintezę nutraukia aktyvintas represorius (žr. p. 273).

Šiuose vyksmuose yra ypatingas **branduolio membranos ir ypač porų komplekso** vaidmuo (4.16 pav.). Pro jį kaip pro sietą įvairiomis kryptimis praleidžiami arba nepraleidžiami genų veiklos produktai, į branduolį pernešami baltymai (būtini DNR replikacijai, reparacijai ar rekombinacijai, chromatino-chromosomų sandarai, aktyvinti receptoriai/transkripcijos veiksniai), nukleotidai ir kt.

Kai kurie virusai (adenovirusai) sugebėjo išnaudoti ir šią eukariotų branduolio savybę. Jie geba priversti ląstelę veikti savo naudai, blokuodami šeimininko-ląstelės mRNR pernašą iš branduolio į citoplazmą. Ląstelės mRNR lieka branduolyje lyg maiše. Pati ląstelė irgi gali valdyti šį reiškinį. Pvz., mRNR molekulės gali būti uždarytos branduolyje tol, kol įvyksta jų splaisingas.

Labai svarbus genų veiklos valdymo etapas – mRNR pernaša ir paskirstymas citoplazmoje.

Šio etapo svarba įsitikinta ištyrus morfogenezės genų koduojamų mRNR paskirstymą ovocituose. Šis vadinamųjų morfogenų paskirstymas ovocite ir nulemia bendrąjį būsimo organizmo planą.



4.16 pav. **Porų kompleksas ir pernaša pro jį**

Daug **mRNR**, tarp jų ir morfogenų, gali būti **neaktyvios, „atsarginės"**– laukti, kol galės veikti. Pirmosios tokio tipo „atsarginės" mRNR buvo aptiktos jūrų ežio ovocituose. Jos pradeda veikti (yra transliuojamos) tik pradėjus vystytis gemalui. O tai įvyksta tik po apsivaisinimo.

Kitas „atsarginių" mRNR tipas sąlygoja greitą atsaką į nepalankius aplinkos veiksnius – antibiotikus, ksenobiotikus ir kt. Šios mRNR yra dvejopos erdvinės sandaros:

neaktyvios formos mRNR ⇄ aktyvios formos mRNR

Perėjimas į aktyvią formą priklauso nuo sąveikos su aplinkos veiksniu (pvz., su streptomicinu, benz(a)pirenu ir kt.):

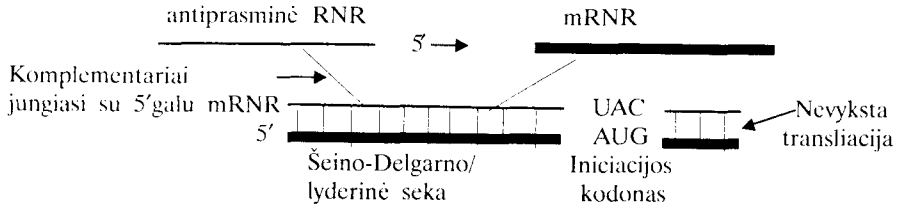
neaktyvi mRNR + aktyvatorius aplinkos veiksnys → aktyvi, transliuojama mRNR

Paprastai keičiasi mRNR lyderinės sekos erdvinė sandara.

Geno produktų (mRNR) aktyvumą vykstant transliacijai **gali keisti specialūs baltymai arba RNR.**

Taip valdomas net ribosominių baltymų kiekis. Nustatyta, kad kai sąlygos transliacijai nepalankios, ribosomų baltymai (kai yra jų perteklius) sudaro kompleksus su ribosomų baltymų mRNR ir slopina jų mRNR transliaciją.

Transliacija gali būti valdoma ir antiprasminėmis RNR. Aptikti genai, kurie koduoja antiprasmines RNR. **Antiprasminė RNR** yra komplementari mRNR 5′ sričiai. Susijungusi su šia sritimi komplementariais ryšiais į dvigrandę RNR, antiprasminė RNR slopina mRNR transliaciją:



Su lyderine 5′ mRNR seka gali jungtis ir specialūs polipeptidai. Pvz., taip valdoma baltymo feritino sintezė. Feritinas suriša ir laiko atsargai geležį, kai yra jos perteklius. Geležis išlaisvinama, kai jos prireikia hemoglobinui sintetinti. Kai nėra geležies, prie feritino mRNR jungiasi specialus polipeptidas, ir ši mRNR netransliuojama – feritinas nesintetinamas.

mRNR ilgaamžiškumas irgi yra labai svarbus genų valdymo veiksnys. Tuo buvo galima įsitikinti ir iš *lac* operono. Viena iš svarbių šio operono valdymo ypatybių yra ta, kad nuo operono struktūrinių genų transkribuojama mRNR yra trumpalaikė. Eukariotų mRNR ilgaamžiškumą gali lemti „uodegos"– **poliA ilgis**. Juo ilgesnė poliA, tuo ilgiau išlieka mRNR. Ilgaamžiškumas gali priklausyti ir nuo aplinkos veiksnių. Pvz., mažas geležies kiekis stabilizuoja kito baltymo transferino mRNR, o didelis – atvirkščiai, skatina šių mRNR irimą. (Transferinai perneša geležį į kepenis arba kaulų čiulpus.)

Eukariotų mRNR gali būti **itin ilgalaikės**. Prisiminkime hemoglobino mRNR. Žinduolių eritrocitų branduolys sunyksta, o baltymo sintezė vyksta, nes hemoglobino mRNR yra ilgalaikės.

Baltymų fosforilinimas – vienas iš svarbių genomo ir geno veiklos valdymo būdų. Keičiama:

- chromatino sandara (fosforilinant histonus, laminos baltymus),
- valdymo ir signalo pernašos baltymų aktyvumas,
- baltymų aktyvumas potransliaciniame etape. Kaip minėta, tai vienas iš itin greito reagavimo būdų. Taip, pvz., paverčiami neaktyviais, „atsarginiais" kai kurie citochromai P-450:

– aktyvus cit. P-450 $\underset{\longleftarrow}{\overset{\text{fosforilinimas}}{\longrightarrow}}$ neaktyvus cit. P-450 (saugomas atsargai). ·

Genome užprogramuoti ir visi pokyčiai, kurie vyksta **bręstant baltymams**.

Genų veiklai, be jau minėto fosforilinimo/defosforilinimo, svarbūs šie pokyčiai:

- perėjimas iš neaktyvios pre/pro-būsenos į aktyvią būseną. Pirminis polipeptidas yra karpomas ir iš jo dalių susistato aktyvus baltymas, nereikalingos aminorūgščių sekos pašalinamos. Taip, pvz., pasigamina aktyvus **insulinas**;
- integracija į ląstelės struktūras arba virsmas laisva forma (kaip yra imunoglobulinų). Lemia signalinis domenas, kurį koduoja lyderinė seka. Nebereikalingą signalinį polipeptidą pašalina specialus baltymas – lyderinė (signalinė) peptidazė. Integraciją, kaip minėta, atlieka specialūs baltymai (šaperonai ir kt.).

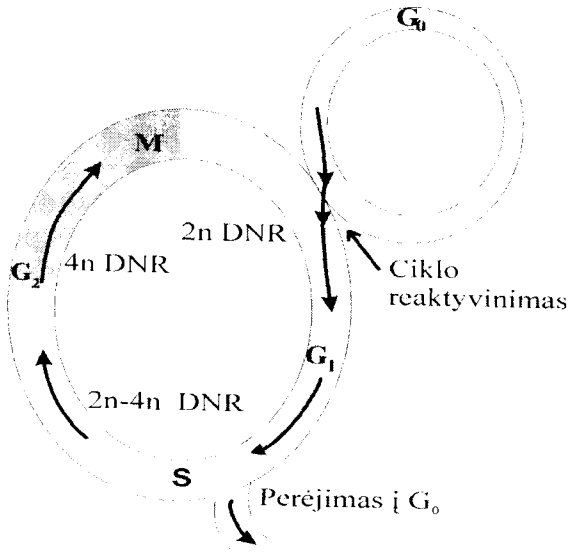
Baltymų brendimo valdymas – greičiausias atsakas į aplinkos ir vidaus veiksnius. Jis nustatomas pagal atsiradusį baltymo aktyvumą, nors naujų baltymų sintezė nevyksta (tyrimo tikslais baltymų sintezė gali būti dirbtinai slopinama, panaudojant transliacijos inhibitorius).

4.6. Ląstelės ciklo valdymas

Ląstelės skirstomos į nuolat besidalijančias, galinčias dalytis tam tikromis sąlygomis ir nustojusias dalytis (tai somatinės, diferencijuotos daugelio audinių/organų ląstelės). Tos ląstelės, kurios dalijasi, praeina keletą stadijų:

- **interfazę** – G_1, S, G_2,
- **mitozę** (siaurąja prasme) – M, susidedančią iš profazės, prometafazės, metafazės, anafazės ir telofazės. Pabaigoje vyksta ląstelės citoplazmos dalijimasis – citokinezė (4.17 pav.). Ląstelės ciklas gali nutrūkti laikinai dėl nepalankių sąlygų ir visam laikui (diferencijuotose ląstelėse). Ląstelės, kuriose ciklas nutrūko, laikomos esančiomis G_0 stadijoje. Ši stadija šiuo metu skirstoma pagal nutrūkimo pobūdį (laikinai ar visam laikui). Skiriami du eukariotų ląstelės dalijimosi tipai: mitozė ir mejozė.

Ląstelės dalijimasis yra valdomas, t. y. ji gauna signalą, kada jai dalytis ir kada nustoti dalytis, kada ląstelei nustoti dalytis laikinai ir vėl grįžti į dalijimosi ciklą. Taip pat valdomi perėjimai tarp stadijų/fazių, tarp mitozės ir mejozės, citokinezės pradžia.



4.17 pav. **Ląstelės ciklas:**
žmogaus sparčiai basidalijančių ląstelių stadijų trukmė tokia: G_1 apie 12 val., S – 6–8 val., G_2 – 3–4 val., M – mažiau kaip 1 val. Bendra trukmė 18–24 val.

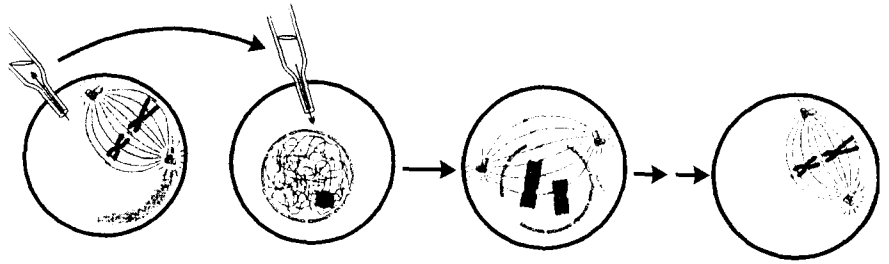
Pirmiausia buvo kuriamos hipotezės. Viena jų sako, kad signalas ląstelei dalytis yra jos **kritinė masė.** Vykstant įvairių medžiagų (pirmiausia biopolimerų) sintezei, ląstelės tūris didėja ir pasiekia tokią apimtį, kad ji pasidaro nepatogi – telieka ląstelei pasidalyti.

Dvi tyrimų kryptys susiliejo į vieną, ir taip atsirado šiuolaikinė samprata apie ląstelės ciklo valdymą.

Brendimą skatinantis veiksnys (MPF). Viena tyrimų kryptis atrodė esanti gana toli nuo ląstelės ciklo. Aptiktas brendimą skatinantis veiksnys – MPF (angl. *maturation promoting factor*).

Varlės (*Xenopus*) ovocituose dalijimasis stabdomas du kartus. Pirmiausia jis sustoja G_2 stadijoje tol, kol hormonai pradeda skatinti mejozę. Tada mejozė sustoja antrojo dalijimosi metafazėje. Tai jau subrendę kiaušinėliai, kurie apvaisinami.

Varlės kiaušinėliai gana stambūs, todėl buvo nesunku mikropipete paimti citoplazmos iš subrendusių kiaušinėlių, praėjusių I mejozės (redukcinį) dalijimąsi, ir suleisti citoplazmą į ovocitą, kuriame branduolys yra G_2 (4.18 pav.). Tokiuose ovocituose tuoj pat prasidėjo mejozė. Hipotetinė medžiaga, sukelianti mejozę (šis veiksnys paplitęs tarp organizmų – nuo mielių iki žinduolių), buvo pavadinta brendimą skatinan-



4.18 pav. **Brendimą skatinančio veiksnio (MPF) aptikimas/įrodymas:**
mikropipete paimta citoplazmos iš kiaušialąstės, esančios II mejozės dalijimosi metafazėje, ir injekuota į ląstelę, esančią G_2 stadijoje. Injekcija paskatino mejozę ir kiaušialąstės brendimą

čiu veiksniu. Tačiau tyrimai nesustojo, ir 1988 m. medžiaga, skatinanti ovocitų brendimą, buvo išaiškinta. Pasirodė, kad tai baltymas, kuris pagal savo molekulinę masę (34kDa) buvo pavadintas p^{34}. Kiek vėliau buvo nustatyta, kad tai fermentas proteinkinazė.

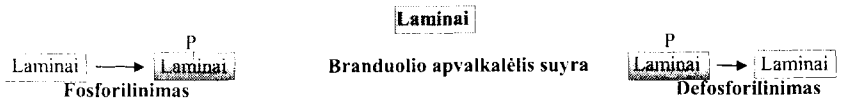
Proteinkinazės jau buvo pakliuvusios į mokslininkų akiratį – jau buvo išaiškinta, kad kai kurie onkogenai koduoja proteinkinazes (žr. toliau). Dėl to susidomėjimas p^{34} baltymu iš karto labai padidėjo.

Proteinkinazės – fermentai, fosforilinantys baltymus. Jos yra dviejų tipų pagal tai, kurios aminorūgštys fosforilinamos – **serin/treoninkinazės** ar **tirozinkinazės**. Ląstelėje daugelio baltymų aktyvumas valdomas fosforilinant (proteinkinazių) ir defosforilinant (fosfatazių) (4.19 pav.).

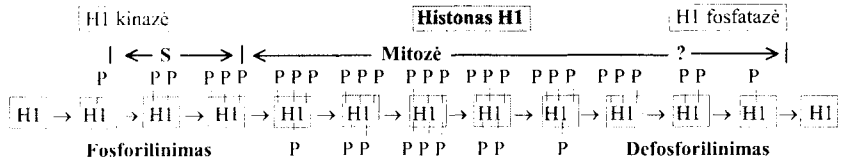
Ląstelės ciklo genai *CDC* ir kritiniai taškai. Kita tyrimų kryptis tikslingesnė. Hartvelas (L. Hartwell) nuo 1974 m. sukūrė ir ištyrė kolekciją mielių *Saccharomyces cerevisiae* mutantų, slopinančių ląstelės ciklą. Šiuos mutantus ir atitinkamus genus jis pavadino *CDC* (angl. *cell division cycle* – ląstelės dalijimosi ciklas). Mutantai buvo ***ts*** (temperatūrai jautrūs) tipo, nes tik tokius mutantus galima dauginti. Normaliai mutacijos, slopinančios ląstelės dalijimąsi, yra mirtinos.

Svarbiausią atradimą padarė Nursė (P. Nurse) su bendradarbiais, tyrusiais mielių *Schizosaccharomyces pombe* ląstelės ciklo mutantus. Svarbiausias jų buvo *cdc2* (didžiosios ar mažosios raidės yra genetikų susitarimas ir būdingas skirtingoms mielių gentims). Nursė įrodė, kad tarp *p^{34}, CDC28, cdc2* galima dėti lygybės ženklą: genas koduoja tą pačią proteinkinazę.

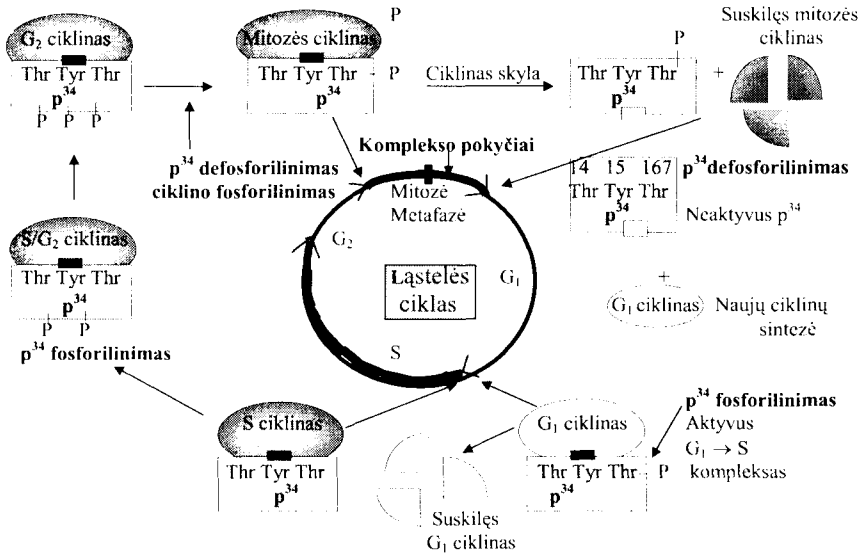
Hartvelas stengėsi nustatyti kritinius ląstelės dalijimosi taškus ir genus, kurie valdo šiuos taškus. Taip buvo nustatyta, kad svarbiausias



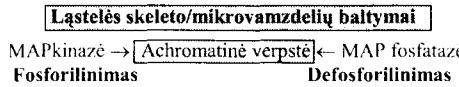
a. Branduolio apvalkalėlio pokyčiai



b. Chromatino kondensacija/dekondensacija



c. Ląstelės ciklo valdymas



d. Achromatinės verpstės susidarymas/išnykimas

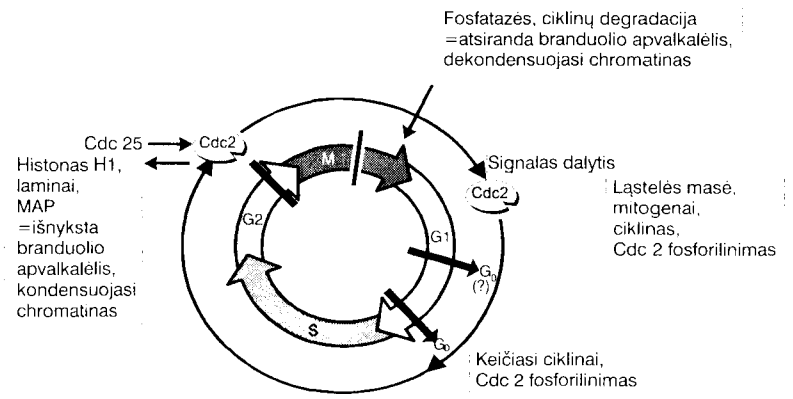
4.19 pav. **Ląstelės ciklo valdymas fosforilinant-defosforilinant ir skaidant baltymus (dėl proteolizės). Keturi suderinti veiksmai mitozėje, reguliuojami proteinkinazių/fosfatazių:**
branduolio apvalkalėlio kitimas – irimas/atsistatymas; chromatino kondensacija/dekondensacija; ląstelės ciklo valdymas; achromatinės verpstės susidarymas ir suirimas, MAPkinazė = mitogeno aktyvinta proteinkinazė, valdo *CDC37*, *CDC20* ir kt. genai

kritinis taškas ląstelės cikle yra **perėjimas iš G_1 į S stadiją**, vadinamas pradžios (STARTO – taip jis žymimas pagal susitarimą) tašku. G_1 stadijoje yra vidinis tarpsnis nuo kurio priklauso, ar ląstelė dalysis ar pereis į G_0. Šiuo metu G_0 skirstoma į du tipus:

- kai visiškai nutrūksta dalijimasis,
- kai dalijimasis nutrūksta laikinai.

Dar vienas itin svarbus kritinis taškas – **perėjimas iš G_2 į M.**

Pagaliau, kaip minėta, ląstelės ciklas gali sustoti **metafazėje**. Tai dar vienas kritinis taškas, būdingas **generatyvinėms ląstelėms**:



Schemoje kritiniai taškai pažymėti skersinėmis juostomis arba rodyklėmis; šalia pažymėti pagrindiniai pokyčiai (žr. toliau).

Kuris kritinis taškas yra svarbiausias, priklauso nuo ląstelių tipo ir jų raidos momento, taip pat nuo organizmo. Daugelio daugialąsčių organizmų svarbiausias taškas yra

$$G_1 \rightarrow S$$

Proteinkinazės ir ląstelės ciklas. Susidomėjimas ląstelės ciklo valdymu paskatino trečią tyrimų kryptį. Buvo ieškoma baltymų, kurių kiekis kinta vykstant ląstelės ciklui. Taip buvo atrasti **ciklinai**. Iš pradžių manyta, kad tai vienas baltymas, bet vėliau nustatyta, jog tai grupė baltymų, kurie reiškiasi įvairiose ląstelės ciklo dalyse. Ciklinai vieni neveikia. Jie sudaro kompleksą su ląstelės ciklo proteinkinazėmis, jas

aktyvindami. Mielės turi tik vieną proteinkinazę Cdc2, bet ląstelės ciklo kritiniuose taškuose keičiasi ciklinai.

Žinduolių ląstelės turi keletą kinazių: Cdc2, Cdk2, Cdk3, Cdk4, Cdk6, Cdk7, kaip ir keletą ciklinų: D1, D2, D3, H, E, A, B ir kt. Komplekse keičiasi ne tik ciklinai, bet ir kinazės:

- kritinis taškas – $G_0 \rightarrow G_1$,
- mitogenas indukuoja kompleksą Cdk4/6 + ciklinai D (be to, veikia ciklinas H + Cdk7);
- kritiniame taške $G_1 \rightarrow S$ – Cdk2 + ciklinas E,
- S stadijoje – Cdk2 + ciklinas A,
- kritiniame taške $G_1 \rightarrow M$ – Cdc2 + ciklinas B. Šis kompleksas ir yra brendimo veiksnys MPF.

Nereikalingus baltymus suskaido proteazės. Mejozei valdyti yra specifinių genų. Apskritai atrandami vis nauji genai/baltymai, kurie veikia ląstelės dalijimąsi.

Ląstelės dalijimasis – suderintų įvykių grandinė. Nuo ko prasideda ląstelės ciklas? Ir šį klausimą padėjo spręsti mielės. Paaiškėjo, kad yra keletas signalų prasidėti ląstelės dalijimuisi, ir jų veikimas suderintas.

Pirmasis signalas ląstelei dalytis yra jos **masė**. Turi būti sukauptos didelės, ypač biopolimerų, energijos išteklių, nukleotidų atsargos, kad ląstelė pradėtų dalytis. Kiaušialąstė/kiaušinis būna sukaupęs tiek atsargų, kad jų pakanka keletui dalijimųsi, tačiau po kiekvieno dalijimosi ląstelės masė mažėja. Šiuo atveju svarbus didelis dalijimosi greitis.

Santykį tarp augimo ciklo ir dalijimosi ciklo valdo specialūs genai. Nurse gavo mielių mutantus (*wee1*), kuriuose šis santykis pažeistas, ląstelės yra smulkios. Mutanto ląstelės dalijasi per anksti. Kito mutanto *cdc 25* ląstelės yra labai stambios, dvigubai stambesnės negu normalios, nes vėluoja citokinezė.

Vadinasi, yra **suderintas ląstelės masės kaupimasis su DNR replikacija**. Taip ir turi būti, nes vienas svarbiausių ląstelės dalijimosi tikslų yra taisyklingai paskirstyti genetinę medžiagą – DNR molekulių kopijas ir visą ląstelės masę. Kai vyksta asimetrinė mitozė ir netolygiai paskirstoma citoplazma, veikia specialūs genai.

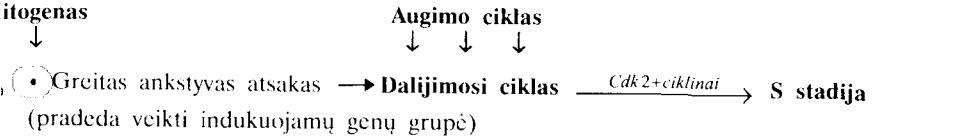
Mielėse nustatyta, kad kartu su *cdc* veikia ir tie genai, kurie lemia achromatinę verpstę ir kitas ląstelės struktūras/baltymus, būtinus mitozei/mejozei. Mielių ląstelės ciklo genų veikla yra suderinta su veikla genų, lemiančių mielių poravimosi tipus.

Žinduolių ląstelės ciklo valdymas. Apie jį labai daug svarbių žinių gauta, ištyrus neprogramuotą somatinių ląstelių dalijimąsi – auglio pradžią. Valdymas dar sudėtingesnis, nes suderintai dalijasi arba nesidalija ne viena ląstelė, o jų grupės.

Žinduolių ląstelės ciklas dalijamas į

- augimo ciklą,
- dalijimosi ciklą.

Abu ciklai suderinti. Kol nėra sukauptos pakankamos aminorūgščių, gliukozės, nukleotidų, energijos atsargos, tol nevyksta antroji ciklo dalis, bet bendrą impulsą dalytis duoda **mitogenai/augimo veiksniai**:



Mitogenai, arba augimo veiksniai, valdo ląstelės dalijimąsi. Žinduolių jie skirstomi į **keturias** klases:

I. Išoriniai (ląstelei) veiksniai: augimo hormonai, epidermio augimo veiksnys ir kt. Jie gali būti specializuoti tik tam tikroms ląstelėms, pvz., epitelio, tada jie valdo tik šių ląstelių dalijimąsi;

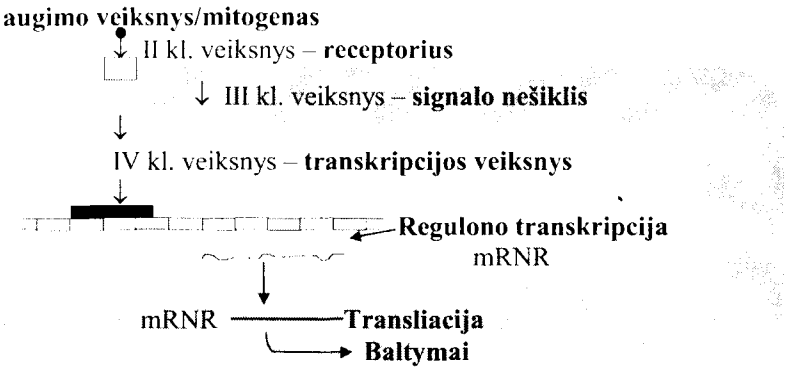
II. Ląstelės paviršiaus receptoriai – dažniausiai proteintirozinkinazės, G baltymai;

III. Signalo nešikliai – irgi dauguma proteinkinazių genų, pvz., kai kurių **onkogenų** (žr. toliau) – *scr, ras, erb*, koduojami baltymai;

IV. Transkripcijos veiksniai, pvz., onkogenų *jun* ir *fos* koduojamas baltymas AP-1, onkogenų *myc, myb* koduojami baltymai. Šiai grupei priskiriami ir antionkogenų (pvz., *RB*, p^{53}) koduojami baltymai, kurie slopina ląstelės dalijimąsi. Tai vėžio supresoriai. Visiems šios grupės veiksniams būdinga sąveika/jungimasis su jų valdomų genų specialiomis nukleotidų sekomis.

Ląstelės dalijimąsi lemiantys genai yra mitogenų/augimo veiksnių valdomi tipiškiausiu, klasikiniu būdu:

- sąveika su ląstelės paviršiniu receptoriumi,
- signalo pernaša į branduolį,
- transkripcijos veiksnių aktyvinimas,
- valdomos genų grupės aktyvinimas:



Mitogenų veikla. Ląstelės ciklas – puikus kaskadinio genų valdymo pavyzdys. Mitogenai valdo kelis šimtus genų. Šie genai lemia ląstelės dalijimąsi ir kai kurias kitas savybes, kurios atsiranda sparčiai dauginantis ląstelėms. Pvz., ankstyvąsias ontogenezės morfogenezės stadijas lemia *NFkB* šeima. Jos koduojamas baltymas yra transkripcijos veiksnys ir koduoja baltymą, homologinį drozofilos baltymui Dorsal (šis lemia dorzalinę-ventralinę /nugaros-pilvo kūno simetriją).

Mitogenai indukuoja ir **transkripcijos veiksnį E2F**, kuris įjungia tuos genus, be kurių veiklos neprasidėtų DNR sintezė, t. y. perėjimas iš G_1 į S. Dauguma jų yra nukleotidų sintezės genai būtent dihidrofolatreduktazės, timidinkinazės, ribonukleotidreduktazės, karbomoilfosfatsintazės-aspartatkarbomoiltransferazės-dihidroorotazės). Jis įjungia pačios DNR polimerazės α geną, taip pat *cdk*/ciklino kompleksą, *c-myc*. *E2F* geną, slopina pBR (žr. toliau).

Vadinasi, **mitogenai įjungia veiklą genų, kurie valdo keletą stambių genų grupių,** šie – mažesnių grupių, o pastarieji – dar mažesnių.

4.7. Vėžio genetika. Nereglamentuotas diferencijuotų somatinių ląstelių dalijimasis

4.7.1. Mutacinė ir virusinė vėžio teorijos. Onkogenai

Vėžys yra normalaus augimo – ląstelės dalijimosi sutrikimas.

Tai šiuolaikinė vėžio kilmės samprata. Iki jos buvo ilgas kelias. Su genetika pradėta sieti, sukūrus mutacinę vėžio teoriją.

Mutacinė vėžio teorija. Kancerogenai. T. Boveri (1914), de Fryzas, Mioleris – mutacijų ir mutagenezės tyrimo pradininkai manė, kad vėžys atsiranda dėl mutacijų. Jeigu taip yra, tai turi būti mutageniški veiksniai, kurie jį sukelia. Taip buvo atrasti **kancerogenai**. Daugelis mutagenų (veiksnių, sukeliančių muatcijas, žr. p. 448) iš tiesų yra kancerogenai. Tai jonizuojantys ir ultravioletiniai spinduliai, nitrozoaminai, policikliniai aromatiniai angliavandeniliai, aminorūgščių – peptidų pirolizės produktai ir kt. Jų savybės nagrinėjamos VII skyriuje.

Šalia kancerogenų/mutagenų, keičiančių genus/genetinę medžiagą, atrasti **vėžį skatinantys veiksniai (vėžio promotoriai)**. Tai veiksniai, kurie patys nesukelia vėžio, bet susidarius sąlygoms skatina jo raidą. Gali būti įvairios sintetinės (forbolo esteriai) arba gamtinės (fenoliai) medžiagos.

Onkogeniniai virusai. 1945 m. L. Zilberis paskelbė **virusinę vėžio teoriją**, pagal kurią vėžį sukelia virusai. Prasidėjo šių virusų paieškos ir tyrimai. Vėžį sukelia kelių grupių – tiek DNR (žr. p. 547): poliomos, adenovirusai, Epšteino-Baro, tiek RNR virusai. Pastarieji pavadinti **retrovirusais** (lot. *retro* – atgal). S. Geršenzonas dar 1954 m. nustatė, kad šie virusai gali būti laisvi ir įsiterpę į ląstelės genomą. Tik jis nesugebėjo išskirti fermento, kuris nuo RNR matricos sintetina DNR. Atskirai vienas nuo kito 1972 m. tai atliko du amerikiečių mokslininkai Teminas (H. Temin) ir Baltimoras (D. Baltimore). Fermentas, kuris sintetina DNR nuo RNR matricos, buvo pavadintas **atvirkštine transkriptaze** (arba revertaze, nuo RNR priklausoma DNR polimeraze).

Visiškai logiška šių tyrimų tąsa: nustatyti, kurie onkoviruso genai sukelia vėžį. Paaiškėjo, kad dažniausiai tai vienintelis genas viruso genome. Tik labai retais atvejais būna jų keletas. Šie genai pavadinti **onkogenais**. Pašalinus, pvz., Rauso sarkomos virusui onkogeną (kuris nuo vėžio pavadinimo žymimas *scr*; taip pavadinti ir kiti onkogenai, aptikti virusuose), virusas tampa **neonkogeniniu**.

Prasidėjus genų klonavimo ir sekvenavimo epochai, įvyko didžiausia staigmena. Bišopas (M. Bischop) ir Varmus (H. Varmus) nustatė, kad onkogenų homologai yra normaliame žinduolių/žmogaus genome. Tai aptinkama nuo virusų klonuotų onkogenų pagamintais molekuliniais zondais.

Pagal kilmę onkogenai yra skirstomi į

- ląstelinius, žymimus *c-onc* (pvz., *c-scr, c-mos, c-abl*),
- virusinius, žymimus *v-onc* (pvz., *v-scr, v-mos, v-abl*).

Atrandami vis nauji onkogenai. Kai kurie jų sudaro dideles **šeimas**, pvz., *c-ras* šeimoje yra per 50 genų, skirstomų į kelis pošeimius: *c-ras, c-rho, c-rab, c-arf, c-sar, c-ran*. Šeimoje genai skiriasi ne tik sandara ir nukleotidų sekomis, bet ir funkcija (pvz., *c-arf, c-rab, c-sar, c-ran* susiję su vezikulomis ir su baltymų pernaša, o *c-ras* valdo ląstelių dalijimąsi ir diferenciaciją, *c-rho* – aktino kompleksą su citoskeletu).

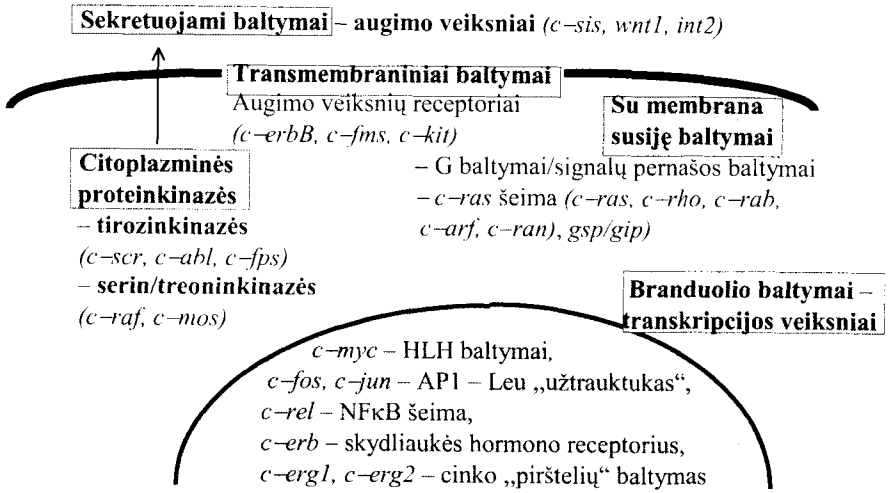
Onkogenų funkcija. Aptikus onkogenus normalių, ne vėžinių ląstelių genome, paaiškėjo, kad **yra dvi to paties geno funkcinės/sandaros būsenos**:

- **nesukelianti vėžio** ir būtina normaliai ląstelės veiklai (tai įrodyta vėliau),
- **sukelianti vėžį** – normalios geno veiklos anomalija.

Nesukeliantys vėžio genai buvo pavadinti protoonkogenais.

Nuo **protoonkogenų** priklauso normalios ląstelės funkcijos – ląstelės dalijimasis ir diferenciacija.

Protoonkogenų koduojami baltymai grupuojami taip:



Daugelio šių baltymų paskirtis išdėstyta 4.5–4.6 skyreliuose. Vienaip ar kitaip visi protoonkogenai susiję su ląstelės dalijimusi. Antai *c-fos* šeimos (*c-fos, c-fosB, c-tra-1, c-tra-2*) koduojami baltymai įeina į kompleksą baltymų, kurie lemia ląstelės ciklo kritinius taškus $G_0 \rightarrow S$ ir $G_1 \rightarrow S$. Kitas protoonkogenas *c-mos* reguliuoja *Xenopus* mejozės I ir II dalijimąsi. Jo mitogenas yra progesteronas.

Vėl mutacinė teorija. Atradus, kad onkogenai, tiksliau, protoonkogenai, yra normalūs ląstelės dalijimosi ir diferenciacijos valdymo (dažniausiai augimo veiksnius koduojantys) genai, susimąstyta, o kaip šie genai tampa patogeniniais, vėžį sukeliančiais.

Vėl teko prisiminti mutacinę vėžio teoriją. Labai intensyviai, kas apskritai būdinga vėžio tyrimams, pradėtos tirti protoonkogenų mutacijos, ir lūkesčiai visiškai pasitvirtino.

> Kad prasidėtų vėžys, protoonkogenai turi virsti onkogenais, t. y. nevaldomais/ne laiku veikiančiais ląstelės dalijimosi/diferenciacijos valdymo genais. Tai atsitinka dėl mutacijų.

O kaipgi virusai? Pasirodo, *v-onc* atsiranda sudėtingu būdu: virusui į savo genomą netiksliai įjungiant protoonkogenus arba šių kopijas, pasigaminusias nuo protoonkogenų subrendusių mRNR.

Vadinasi, onkogeniniais virusais tampama seniai virusų genetikoje žinomu būdu (žr. p. 544). Virusas, išeidamas iš ląstelės, gali įsijungti į savo genomą dalį šeimininko ląstelės genetinės medžiagos. Jeigu tai įvyksta netiksliai, tas „užgriebtas“ genas savaime tam-

pa mutantiniu, nenormaliu. Dažnai *v-onc* neturi 5′-geno dalies. Daugelis ištirtų *v-onc* neturi intronų. Intronai prarandami bręstant pre-mRNR (vykstant splaisingui). Vadinasi, šie *v-onc* pasigamino ir įsiterpė į viruso genomą visiškai kitokiu būdu, nuo subrendusios mRNR, dalyvaujant retroviruso atvirkštinei transkriptazei.

Vėl atsirado vietos ir kancerogenams. Šiuo atžvilgiu labai gerai ištirtas odos vėžys, kuris JAV sudaro per 50% vėžinių ligų.

Vienas iš kancerogenų, sukeliančių odos vėžį, yra ultravioletiniai spinduliai (UVB). Jie yra mutageniški, bet neskvarbūs, todėl sukelia mutacijas tik tose ląstelėse, į kurias prasiskverbia. O prasiskverbti jie gali tik į atviras Saulės šviesai (UV) paviršines odos ląsteles. Todėl nuo UV spinduliuotės labiausiai nukenčia veidas (ypač nosis – labiausiai atsikišusi), rankos. Pirmiausia ir atsiranda šių kūno dalių odos vėžys.

Tačiau protoonkogenų veikla yra valdoma. Taigi pavojingiausios mutacijos yra tų genų, kurie valdo protoonkogenus. Iš pradžių jie vadinti antionkogenais. Šiuo metu populiaresnis jų pavadinimas **vėžio supresoriai**, pagal veiklos pobūdį. **Jie slopina somatinių ir kitų susiformavusių audinių ląstelių dalijimąsi**. Dėl jų veiklos **ląstelės pereina iš G_1 į G_0**.

Vėžys dažniausiai pradeda vystytis tada, kai įvyksta kurio nors vėžio supresorių geno, pvz., p^{53}, mutacija.

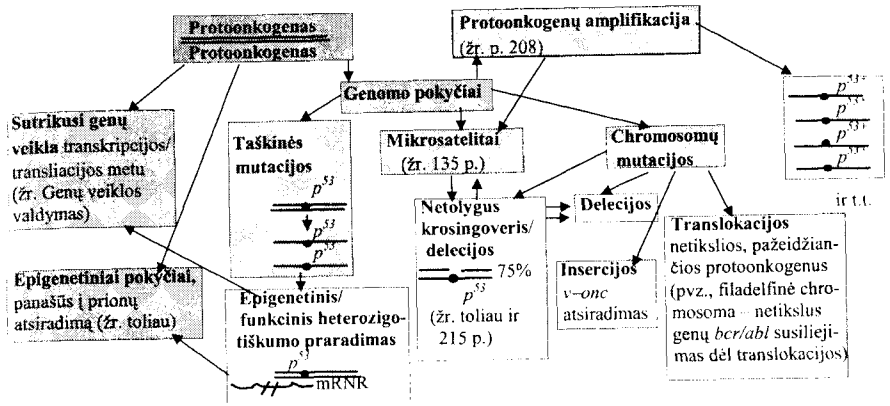
Žmogus, aukštesnieji eukariotai turi po dvi homologines chromosomas, o mutacijos yra recesyviosios. Todėl mutantiniam onkogenui pasireikšti būtinos mutacijos abiejose homologinėse chromosomose. Pvz., p^{53} geno tai atrodytų taip:

$$\frac{+}{+} \xrightarrow{\text{UV}} \frac{p^{53}}{+} \xrightarrow[\text{UV}]{\text{Pakartotinė mutacija}} \frac{p^{53}}{p^{53}} \longrightarrow \text{Vėžys}$$

Amerikiečių genetikai nustatė, kad pirmąją šio konkretaus geno mutaciją „parūpina“ mamytės, kaitindamos savo išrengtus vaikučius saulėje. Pirmoji p^{53} geno mutacija atsiranda iki 15 m. amžiaus.

Antroji atsiranda nelaukiama. Nustatyta, kad vyresnio amžiaus žmonių somatinių ląstelių mutacijų ir vėžio dažnis padidėja dramatiškai – 10^3–10^7 kartų, nes senstant sutrinka daugelis būdų apsisaugoti nuo DNR pažaidų (žr. p. 497), pirmiausia **DNR pažaidų reparacija**. Be to, sutrinka laisvųjų radikalų/antioksidantų balansas, ksenobiotikų metabolizmas ir kt. Todėl šioje amžiaus grupėje vėžys yra dažnas.

Protoonkogenas gali įvairiai virsti onkogenu ne tik dėl mutacijų, bet ir dėl sutrikusio genų veiklos valdymo, atsiradusio dėl fiziologinių priežasčių transkripcijos/transliacijos etapuose:

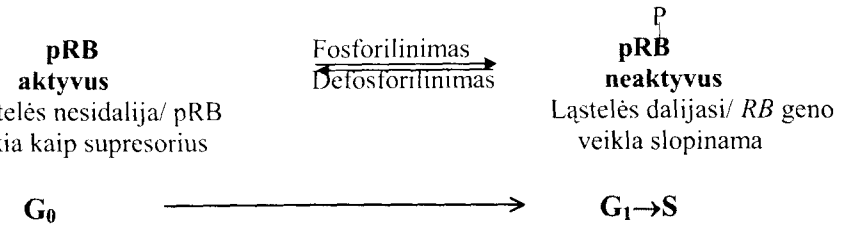


4.7.2. Vėžio supresoriai. Vėžys – laipsniško mutacijų kaupimosi pasekmė

Antionkogenai/vėžio supresoriai. Priešingai onkogenams, vėžio supresoriai slopina ląstelių dalijimąsi, nulemia ląstelių perėjimą iš G_1 į G_0, slopina $G_1 \rightarrow S$. Kaip tik dėl šių genų veiklos diferencijuotos ląstelės nustoja dalytis. Šiuo metu žmogaus genome yra žinoma mažiausiai 13 vėžio supresorių. Dažniausiai jie aptinkami tiriant paveldimas (šeiminio) vėžio formas. Jų reikšmė vėžio raidai ypač svarbi. Vėžio supresoriai slopina netgi vėžinių ląstelių dalijimąsi. Jie valdo onkogenų veiklą. Kol šie vėžio supresoriai veiklūs, ląstelės lieka G_0 stadijoje. Geriausiai ištirti vėžio supresoriai *RB* ir p^{53}.

***RB* genas** aptiktas tiriant **retinoblastomą**. Ji (dažnis apie 1:18000) prasideda dar vaikystėje kaip balkšva dėmė ant vienos ar abiejų akių (vadinamoji „katės“ akis). Negydomas auglys plečiasi. Ligonių 13-ojoje chromosomoje dažnai aptinkama ilgojo peties 14.1–14.2 segmento delecija (del 13q14.1–14.2–). Vėliau paaiškėjo, kad ir *RB* geno taškinė mutacija sukelia retinoblastomą, o dar vėliau, – kad asmenys, kurių genome įvyko *RB* geno delecija arba taškinė mutacija, linkę sirgti įvairiomis vėžio formomis, ne tik retinoblastoma.

Kaip jau minėta, pRB baltymas jungiasi su transkripcijos veiksniu E2F, ir tai slopina $G_1 \rightarrow S$. Ląstelės nesidalija. RB baltymo aktyvumą valdo proteinkinazės. pRb baltymas yra aktyvus, t. y. slopina ląstelės dalijimąsi, kai yra defosforilintas. Kai jis yra fosforilinamas, nustoja veikti kaip supresorius, ir ląstelės dalijasi:

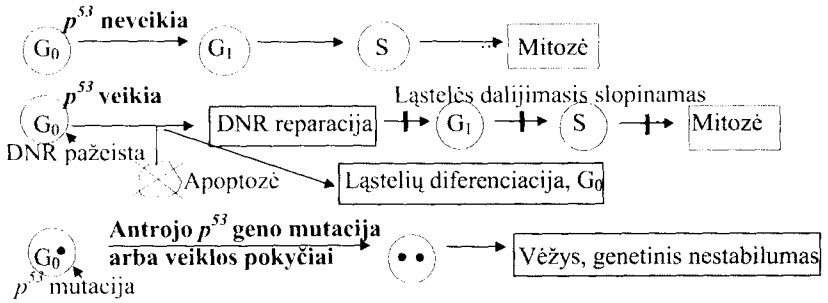


pRB aktyvacija/inaktyvacija irgi yra valdoma. Fosforilinimą sukelia onkoproteinas E1A, o slopina augimo inhibitorius TGF-B1.

Vėžio supresorius p^{53} dar geriau ištirtas. Jį aptiko 1990 m. Malkinas (D. Malkin) su bendradarbiais, tirdamas keletą šeiminio vėžio formų, pirmiausia **Li-Fraumenio sindromą**. Šiam sindromui būdingas polinkis sirgti vėžiu gana ankstyvame amžiuje. Iki 30 m. amžiaus suserga apie 50% asmenų, tuo tarpu visoje žmonių populiacijoje vėžiu serga 1% šio amžiaus asmenų.

Genas (17q13) koduoja 53 kDa baltymą, kuris slopina ląstelės dalijimąsi G_1 stadijos viduryje. Iš čia ir geno pavadinimas p^{53}. Geno veikla susijusi su DNR reparacija. Ląstelėse, kuriose yra pažeista DNR, vyksta intensyvi p^{53} geno raiška, ir ląstelės ciklas stabdomas, kol bus ištaisytos DNR pažaidos.

Kai p^{53} baltymo pasigamina daug (genas p^{53} yra itin aktyvus), gali visiškai nutrūkti ląstelės dalijimasis ir vykti jos diferenciacija arba ląstelę gali ištikti programuota žūtis – **apoptozė** (žr. toliau).

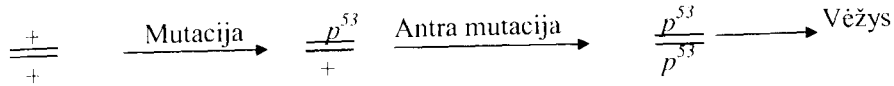


p^{53} geno mutacijos yra vienas dažniausių žmogaus vėžinių ląstelių pokyčių genome. Kai yra nepaveldimas (ne šeiminis) vėžys, mutacijos atsiranda somatinėse ląstelėse; ten ir vystosi auglys. Antai kai yra storosios žarnos papilominis vėžys, net 86% ligonių genome aptinkama p^{53} geno mutacija, dažniausiai geno delecija (75% pacientų). Taškinės mutacijos yra keturiuose „karštuosiuose taškuose", turtinguose GC porų. C gali būti metilinamas, o metilintas C deaminuojant virsta T. Taip atsiranda taškinės mutacijos.

Kadangi p^{53} veikla susijusi su DNR reparacija, geno p^{53} mutacijos padidina kitų genų mutacijų dažnį. Atsiranda genetinis nestabilumas. Kitų genų mutacijų dažnis padidėja 20 kartų.

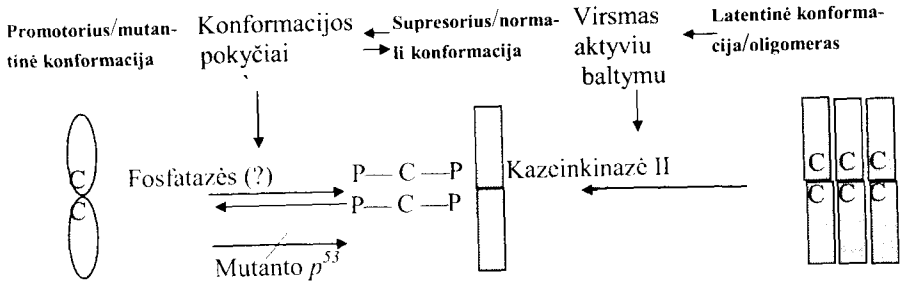
Visų vėžio supresorių ypatybė: mutacijos yra recesyviosios ir gali pasireikšti/sukelti vėžį tik **homozigotose.**

Vadinasi, vėžiui vystytis mutacijos vienoje chromosomoje nepakanka, turi įvykti mutacija ir antrame gene p^{53+} kitoje homologinėje chromosomoje:

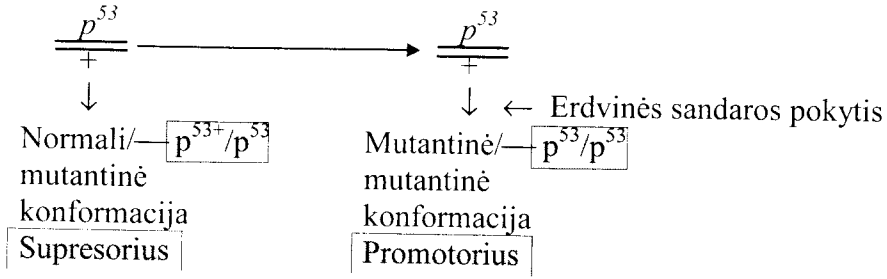


Bet ne tik mutacijos vėžio supresorių genuose yra vėžio priežastis. Gali vykti genų koduojamų produktų-baltymų sąveika. Po normalių pRB ir p^{53} baltymų sąveikos su virusų onkoproteinais pRB, p^{53} ir kiti baltymai supresoriai neslopina ląstelės dalijimosi.

Dar vienas įdomus ir svarbus sąveikos būdas buvo aptiktas tiriant p^{53} baltymo sandarą. Jis labai panašus į prionų atsiradimą (žr. p. 250). Anot Donhoverio ir Breidlio (L. A. Donehower, A. Bradley, 1993), p^{53} baltymas yra trejopos konformacijos (erdvinės sandaros):



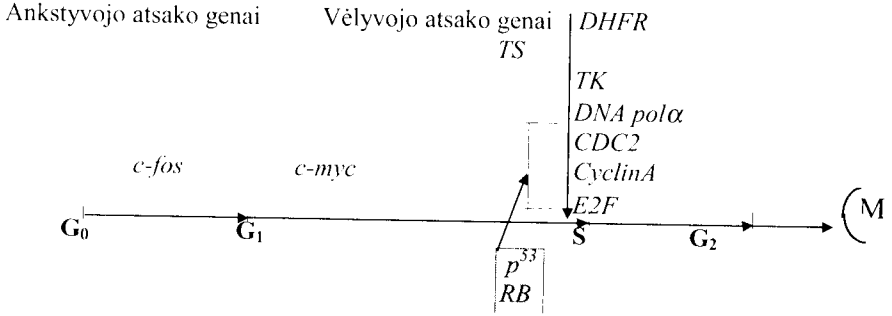
Heterozigotose mutantinis baltymas (ląstelės dalijimosi promotorius) skatina normalios konformacijos baltymo (supresoriaus) virsmą promotoriumi/mutantine baltymo forma:



Šie konformacijos pokyčiai vyksta dalyvaujant valdymo baltymams/fosfatazėms. Genas neturi TATAA ir CAAT sekų, todėl nėra griežtai nustatytos jo transkripcijos pradžios. Transkripcijos pradžia priklauso nuo prie geno prisijungiančių valdymo baltymų. Vyksta alternatyvus splaisingas. Dėl šių ypatybių yra didelis p^{53} baltymo polimorfizmas. ***p^{53}* geno homologų nerasta bestuburių genome.**

Ištyrus įvairias šeiminio vėžio formas, aptikti kiti vėžio supresoriai: *WT1* (11p) – Vilmso vėžio, *NF1* (17q) – 1-ojo tipo neurofibromatozės, *DCC* ir *APC* – storosios žarnos vėžio (žr. žemiau) ir kt.

Vėžio supresorių koduojami baltymai sąveikauja su genais, kurių veikla yra **atsakas į mitogeną**:



Vėžio raida. Vėžys – daugelio **mutacijų sankaupa**. Papilominis storosios žarnos vėžys (šeiminė adenomatozinė polipozė) yra kol kas pavyzdys, kaip, kaupiantis mutacijoms, progresuoja vėžys:

Nuo padidėjusio epitelio ląstelių dalijimosi → **Į nepiktybinę adenomą** → **Į storosios žarnos karcinomą** → **Metastazes**

Iki karcinomos turi įvykti bent trijų vėžio supresorių homozigotinės mutacijos (dvigubos abiejose homologinėse chromosomose): be jau minėtojo p^{53}, dar *DCC* (angl. *deletion in colorectal carcinoma*), *APC* (nuo *adenomous polyposis coli*), onkogeno *c-ras* ir kitų, kol kas nenustatytų:

Chromosoma	5q21	?	12p12	18q21.3	17p12–13	? ?
Pokytis	Delecija	Geno mutacija	Aktyvacija	Delecija	Delecija	Kiti pokyčiai
Genas	*APC*	DNR hipometilinimas	*c-ras*	*DCC*	p^{53}	*c-neu* *c-erb*

Normalus epitelis → Padidėjęs epitelio dalijimasis → Ankstyvoji adenoma → Vidutinė adenoma → Vėlyvoji adenoma → Karcinoma ···metastazės

Taigi vėžys vystosi iš tų ląstelių, kurių genome susikaupia daug mutacijų. Ar neatrodo, kad vėžys yra savotiškas dramatiškas būdas populiacijai atsikratyti genotipų, kurie yra sukaupę daug žalingų mutacijų? Todėl neturėtų stebinti, kad vyresniojo amžiaus žmonių populiacijoje vėžio dažnis padidėja 10^3–10^7 kartų. Laikui bėgant somatinėse ląstelėse kaupiasi mutacijos.

Ryšys su mutacijų kaupimusi akivaizdus ir todėl, kad kitas storosios žarnos vėžio tipas – nepapilominis vėžys atsiranda dėl mikrosatelito $(CA)_n$ nesuporuotų nukleotidų reparacijos gene.

Apoptozė (gr. *apoptosis* – iškritimas) – reiškinys, kuriuo šiuo metu visiškai pamatuotai labai domimasi. Tai užprogramuota (iš anksto numatyta) ląstelių žūtis.

Pirmiausia 1951 m. ji aptikta ląstelių, kurios, atrodytų, neturi nieko bendra su vėžiu, būtent kraujo ląstelių, kurios paprastai atsinaujina kas 7 dienos. Susidarius ląstelių pertekliui, šios žūva iki normalaus (tiksliau, reikiamo) skaičiaus ribos. Kraujo vėžio/leukozių atvejais kaip tik sutrinka šis balansas tarp senų ląstelių žūties ir naujų ląstelių atsiradimo.

Geriausiai apoptozė ištirta nematodo *Caenorhabditis elegans* (žr. V skyrių). Nustatyti genai, kurie valdo šį reiškinį (*ced 9*). Žinduolių protonkogenai *c-myc*, *H-ras*, p^{53} aktyvina apoptozę, o *bcl 2* yra apoptozės supresorius. Apoptozę valdantys genai aktyvina daugiausia tuos genus, kurių koduojamos nukleazės ir proteazės skaido baltymus ir nukleorūgštis. Skaidymo produktai – aminorūgštys ir nukleotidai – panaudojami kitose ląstelėse.

Manoma, kad tik pradėjusios nereglamentuotai dalytis somatinės ląstelės sunaikinamos iš vidaus, aktyvinant apoptozės genus. Be to, apoptozės genams talkina imuninė sistema, ypač makrofagai.

Sutrikus apoptozei, vystosi auglys.

4.8. Genų evoliucija/lyginamoji genetika

Vienų smulkiau – hemoglobinų, citochromų P-450, kitų prabėgomis – kaip imuninio atsako, morfogenezės – svarbių genų grupių

evoliucija aprašyta. Kaip buvo galima įsitikinti, šie tyrimai padeda atskleisti genų/genų grupių veiklos ypatybes.

Genų evoliucijos tyrimo metodai. Ypač daug žinių gaunama lyginamosios genetikos metodais. Palyginus tą patį geną arba genų grupę įvairiuose organizmuose, nustatoma, kuriose organizmų grupėse atsirado pirmtakas genas ir pan. Metodiškai tai tapo įmanoma, kai buvo sukurti DNR molekulinės hibridizacijos (vadinamasis zooblotingas) ir molekulinių zondų metodai. Buvo galima nustatyti organizmų giminingumo laipsnį ir apskritai, kuriose organizmų grupėse yra tiriamasis genas; genai klonuojami ir sekvenuojami (tai panaudota ne tik gaminant molekulinius zondus) – galima lyginti tą patį geną įvairiuose organizmuose ir nustatyti jo evoliucijos kryptis. Daug žinių gauta ir iš tokių sričių kaip mutagenezė, genetinė rekombinacija, nes taip išaiškinti būdai, kaip vyksta genų evoliucija.

Ortologiniai ir paraloginiai genai. Pagal kilmę genai yra dviejų tipų:

- **ortologiniai genai** yra kilę iš vieno bendro geno-protėvio, bet **tas pats genas** įvairiuose organizmuose evoliucionavo įvairiomis kryptimis (pvz. citochromo c genas);
- **paraloginiai genai** irgi kilę iš vieno bendro geno-protėvio, bet atsirado dėl duplikacijų ir evoliucionavo to paties organizmo genome į skirtingas funkcijas lemiančius genus.

Pvz., paraloginiai yra visi citochromų P-450 genai, visi imuninio atsako genai. Pastaruoju metu paaiškėjo, kad ir didelė grupė DNR reparacijos genų, hemoglobino genai žinduolių, žmogaus genome yra paraloginiai.

Evoliucijos greitis ir genų evoliucijos/išsiskyrimo (divergencijos) laipsnis nustatomas dviem būdais:

- pagal DNR homologiją/divergenciją,
- pagal geno koduojamo baltymo divergenciją/homologiją.

Baltymo divergencija išreiškiama minėtuoju evoliucijos periodo vienetu.

Evoliucijos periodo vienetas – tai laiko tarpsnis (milijonais metų), per kurį baltymo aminorūgščių sudėtis pasikeičia 1% (žr. p. 234).

Kaip ir DNR divergencija, jis yra individuali geno ypatybė, taigi įvairių genų labai skiriasi. Konservatyvūs baltymai yra histonas H4 ir citochromas c. Ypač sparčiai evoliucionuoja imuninio atsako genai, net ir šiomis dienomis. Labai intensyviai kito ir fibrino genai, todėl jie tinka artimų rūšių filogenijai tirti.

Antai kai kurių baltymų aminorūgščių pakaitų dažnis (%) per 100 milijonų metų yra toks:

fibrino	– 90,	insulino	– 4,
augimo hormono	– 37,	citochromo c	– 3,
imunoglobulinų	– 27–39,	histono H4	– 0,06.
hemoglobino	– 14,		

Geno evoliucijos greitį valdo atranka. Tačiau manoma, kad gene gali būti **neutralūs pokyčiai** (neutralios mutacijos). Pasak Kimuros (M. Kimura) ir Kingo (J. L. King), Džiukso (T. H. Jukes), gali vykti neutrali geno ir viso genomo evoliucija. Tačiau šis klausimas ginčytinas. Gali pasireikšti netiesioginis – pleiotropinis mutacijos poveikis, geno lygmeniu – priklausomybė nuo konteksto, gretimų nukleotidų poveikio. Atrodytų, yra neutralios daugelio kodonų trečiojo nukleotido mutacijos, nes gana dažnai visi keturi deriniai su trečiuoju nukleotidu koduoja tą pačią aminorūgštį. Tačiau mutacija trečiajame kodono nukleotide veikia mutacijų dažnį kituose dvejuose nukleotiduose (žr. p. 525).

Morfologinės ir molekulinės evoliucijos tempai nesutampa. Antai šimpanzės DNR nuo žmogaus skiriasi tik 1,5–2,5%. Tai statistinės paklaidos ribose, nors morfologiniai skirtumai akivaizdūs. Tuo tarpu dviejų *Xenopus* rūšių (*Xenopus laevis* ir *Xenopus borealis*) DNR skiriasi 15–20%. Vadinasi, tarprūšinė DNR divergencija šiuo atveju didesnė negu tarpgentinė. Dar ryškesni morfologinės ir molekulinės evoliucijos nesutapimai pagal atskirus baltymus. Žmogaus ir makakos citochromas c skiriasi tik viena aminorūgštimi, nors abiejų taksonų divergencija įvykusi prieš 40–50 milijonų metų.

Kovarionai. Įvairiose geno/baltymo dalyse divergencija/homologijos praradimas vyksta irgi nevienodu greičiu. Gene išskiriamos konservatyviosios, ir labiau polimorfinės/kintančiosios dalys. Ypač konservatyvios, pavyzdžiui, yra valdymo sekos arba nukleotidų sekos, koduojančios aktyvius baltymo centrus. Arklio ir kiaulės citochromai c skiriasi 17 aminorūgščių (iš 104), bet, nepaisant to, turi beveik identišką tretinę sandarą.

Baltymo sandaroje išskiriami **kovarionai** – aminorūgštys, kurios keičiasi sparčiau negu kita baltymo dalis. To paties baltymo, bet skirtingų organizmų kovarionai dažniausiai skiriasi. Citochrome c keičiasi tik 4–10 aminorūgščių.

Genome gali būti genų, kurie organizmuose-pirmtakuose kodavo vienokią savybę, o iš jų kilusiuose organizmuose – kitokią, arba dar kurioziškesnis atvejis, kai genome yra „užsikonservavusių" genų. Tokie, pvz., yra genai, lemiantys dantis. Paukščių genome genai išliko „tylūs" per 200 milijonų metų. Kolaras (E. J. Kollar) ir Fišeris (C. Fischer) 1980 m. atliko neįtikėtiną bandymą: pelės mezenchimos ląsteles augino kartu su vištos ryklės epitelio gabalėliais. Vištos oralinis epitelis reagavo į pelės oralinę mezenchimą, ir iš epitelio ląstelių susidarė struktūros, panašios į dantų emalio struktūras (4.20 pav.). Vadinasi, genai buvo potencialiai veiklūs, tik užsikonservavę. Jų veiklai trūko reikalingo signalo iš gretimų ląstelių (toks valdymo būdas įprastas individualioje raidoje, žr. p. 370).

Ortologinių genų evoliucija gali vykti įvairiai, bet pagrindinis būdas – **taškinės mutacijos** geno ribose. Dažniausiai tai nukleotidų pakaitos: viena nukleotidų pora keičiama kita, vietoj vieno kodono susidaro kitas kodonas. Taip ir keičiasi aminorūgštys kovarionuose. Mutacijos kovarionuose gali sukelti mutacijas kitose kovariono vietose. Vietoj pakaitų gene gali būti smulkios delecijos (iškritos) arba intarpai (insercijos) į geną. Kaip vėliau paaiškėjo, daug genų pasikeitė dėl paprastųjų kartotinių sekų (mikrosatelitų).

A B

4.20 pav. **„Hibridinis" dantis, susidaręs iš vištos gemalo oralinio epitelio ir pelės gemalo dentalinės mezenchimos:**
A – vištos gemalo oralinis epitelis, iš kurio vystosi primityvus emalinis organas, jame yra pelės gemalo mezenchima; *B* – gerai išsivystęs hibridinis dantis (iš E. J. Kollar, C. Fisher, 1980)

Tačiau nauji genai negali atsirasti tik dėl nukleotidų ir aminorūgščių pakaitų.

Genų susiliejimas – būdas tiek ortologiniams, tiek ir paraloginiams genams atsirasti. Jis gali vykti dvejopai dėl rekombinacijos/translokacijų ir dėl tiesioginio gretimų genų susiliejimo, iškritus tarpikliui (speiseriui), skiriančiam du gretimus genus.

Viena geno dalimi genai gali būti homologiniai, kita – ne.

Dėl tarpiklio tarp dviejų artimai sukibusių genų delecijos genai irgi susilieja į vieną. Tokiu būdu atsirado daug genų, koduojančių **polifunkcinius baltymus**. Pavyzdys jau keletą kartų minėtas – tai bakterijų DNR I polimerazės (*polA*) genas. DNR I polimerazė atlieka tris funkcijas: polimerazinę, 3′→5′ ir 5′→3′ – egzonukleazinę, ir ji sudaryta iš dviejų domenų. Domeninė baltymo sandara dažniausiai atsiranda susiliejus genams arba jiems keičiantis geno dalimis. Antai vadinamasis VIII veiksnys, kuris svarbus kraujui krešėti, yra sudarytas iš trijų domenų A, B, C. Vienas iš šių domenų – A yra homologinis ceruloplazminui – serumo baltymui, kuris prisijungia vario joną. Manoma, kad *MHC* genai pirmą kartą „susikonstravo" bent iš trijų genų prieš 400 milijonų metų.

Genų su(si)liejimas labai dažnai naudojamas genų inžinerijoje.

Duplikacijos ir divergencija yra pagrindinis būdas atsirasti paraloginiams genams. Dažniausiai nauji genai atsiranda dėl **duplikacijų**, o po to – dėl **divergencijos,** kuri įvyksta kaupiantis duplikuotuose genuose taškinėms mutacijoms. Taip atsiranda genų ir baltymų šeimos. Jas koduoja duplikuoti genai. **Genų šeima** – grupė bendros kilmės genų, kurių koduojančios dalys yra panašios.

Labiau nutolę genai, bet kai kuriuos baltymo domenus koduojantys tuos pačius, sudaro **superšeimas**, pvz., Ig genų/imunoglobulinų superšeima. Superšeimos yra gausios. Translokacijos šiuos duplikuotus genus gali išskirti, išbarstyti po chromosomas. Taip yra, pvz., su citochromų P-450 genais.

Dėl duplikacijų genome atsirado ir **kartotinės sekos**. Antai jaučio albumino gene yra 9 kartotinės sekos. Jos šiek tiek skiriasi, kai kurios invertuotos (apsisukusios 180°) ir sudaro palindromus.

Genų grupės/šeimos evoliucijoje dažniausiai pasireiškia visi aukščiau aprašyti būdai.

V. RAIDOS (ONTO- MORFO-) GENETIKA

5.1. Determinacija

5.1.1. Determinacija ir diferenciacija. Transdeterminacija. Totipotenciškumo problema

Įvairios organizmų grupės turi savitų raidos ypatybių, ir tai yra šių organizmų genetikos tyrimų uždavinys. Suprantama ir tai, kad centrinis onto-morfogenetikos objektas yra **žmogus**. Bet nepaisant kiekvieno organizmo savitumo yra bendri morfogenezės-ontogenezės valdymo dėsniai ir onto-morfogenetikoje naudojami tie modeliniai organizmai, kurie parankiausi vienam ar kitam reiškiniui tirti.

Objekto reikšmė morfogenetikoje yra ypač svarbi, todėl šiai problemai tirti atsirado naujų genetinių objektų, tokių kaip nematodas *Caenorhabditis elegans*, kurio raida šviesiniu mikroskopu tiriama nuo apvaisinto kiaušinėlio iki subrendusios kirmėlaitės, arba gleivūnas *Dictyostelium discoideum*, kuris iš vienaląsčio organizmo gali virsti daugialąsčiu, sudėtingos sandaros.

Pravertė netgi tokie paprasti, nesudėtingi organizmai kaip virusai ir bakterijos.

Virusams irgi būdinga raida nuo DNR arba RNR molekulių iki intaktinio viruso. Sudėtingiausias jų raidos momentas – kapsido susidarymas.

Bakterijų raida paprastesnė negu virusų. Neįvyksta didelių pokyčių, išskyrus genų veiklos pokyčius, nagrinėtus III ir IV skyriuje. Kai kurios bakterijos (pvz., *Bacillus subtilis*) nepalankiomis sąlygomis sudaro sporas. Tai tapo vienu iš morfogenetikos modelių. Sporuliacijos eigoje keičiasi trijų genų grupių veikla. Ji priklauso nuo **σ (sigma)** veiksnio. Palankiomis sąlygomis spora virsta aktyvia ląstele. Vėl veikia rinkinys vienas kitą keičiančių sigma polipeptidų. Tokio tipo genų valdymas aptiktas daugelyje organų raidos/ląstelių diferenciacijos reiškinių, tik veikia kiti valdymo veiksniai, ne sigma. Principas tas pats – laipsniškai įjungiamos skirtingos genų grupės (ankstyvieji, vidutinio ankstyvumo, vėlyvieji genai).

Pagrindinę ontomorfogenetikos problemą, kaip minėta, suformulavo Veismanas dar 1882 m.

Kodėl ląstelėms dalijantis atsiranda nelygiavertės, diferencijuotos ląstelės, kai jos turėtų būti vienodos?

Žmogaus organizme yra daug įvairių tipų ląstelių. Visų jų pradžia – apvaisinta kiaušialąstė.

Ontogenetikos uždavinys yra dar sudėtingesnis – nustatyti, kaip iš pavienių ląstelių formuojasi sudėtingi organai.

Veismano įtakoje suformuluota ir kita bendro pobūdžio problema. Jis manė, kad somatinės ląstelės praranda dalį savo genetinės medžiagos. Taip atsiranda skirtumai tarp generatyvinių ir somatinių ląstelių. Juo ląstelė labiau specializuota, tuo daugiau ji praradusi genetinių veiksnių (žr. 1.2 pav.). Todėl kyla klausimas,

- ar diferencijuotos ląstelės yra generatyvinėms lygiavertės – **totipotencinės,**
- ar jos yra **netotipotencinės,** skirtingų ir nelygiaverčių generatyvinėms ląstelėms genetinių galimybių.

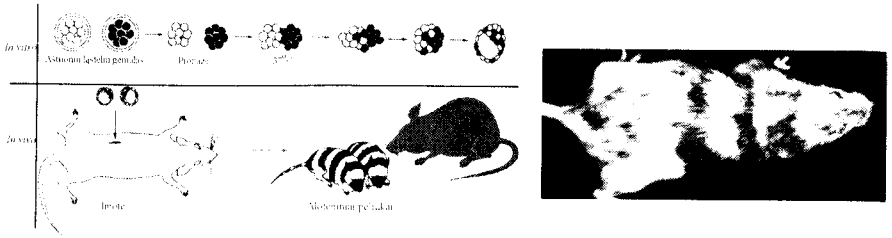
Šie klausimai nagrinėjami trečiajame skyriuje (Genomo pertvarka), ir atsakymas į juos yra nevienareikšmis, negalutinis. Trumpai galima priminti tokius teiginius:

- somatinės ląstelės fenotipiškai skiriasi nuo generatyvinių ląstelių;
- pokyčių pobūdis priklauso nuo diferencijuotų ląstelių funkcijos;
- genotipo pokyčiai diferencijuotose ląstelėse įvairūs:
  - vienose jų įvykę negrįžtami viso genomo arba jo dalies pokyčiai (pvz., žinduolių eritrocituose – sunykę branduoliai),
  - kitose ląstelėse įvyko genomo pokyčiai, bet jie grįžtami (kaip rDNR amplifikacija ovocituose),
  - dar kitose ląstelėse įvykę įvairaus stabilumo epigenetiniai pokyčiai, dėl kurių pats genomas (DNR nukleotidų sekos) nesikeičia;
- dažniausiai somatinės ląstelės yra populiacija, kurioje įvairiu santykiu pasiskirsčiusios nepakitusio genomo ląstelės, su grįžtamais ir negrįžtamais genomo pokyčiais. Pavyzdys – genų amplifikacija prisitaikant prie didėjančios nuodo dozės.

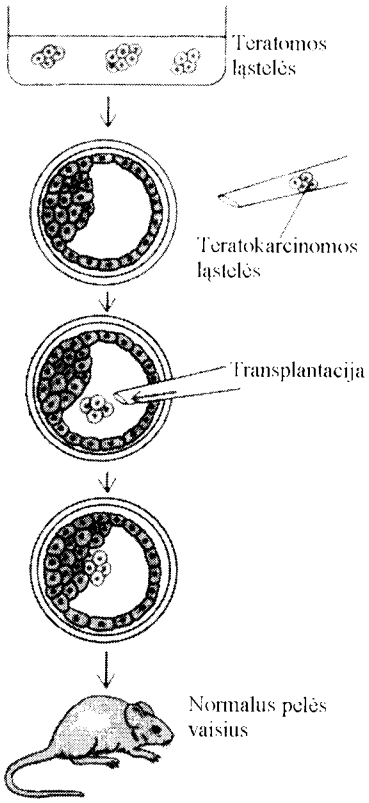
Susidomėjimas somatinių ląstelių totipotenciškumu, grįžtamais-negrįžtamais genomo pokyčiais šiuo metu ypač didelis dėl žinduolių klonavimo.

Klonavimas. Branduolių persodinimas iš diferencijuotų ląstelių į nediferencijuotas neapvaisintas kiaušialąstes/ovocitus, kuriems prieš

23. 1313



5.1 pav. **Alofeninių pelių gavimas**:
pronaze pašalinta skaidrioji zona ir sumaišytos blastomeros dviejų pelių linijų: juodais ir baltais plaukais. Tokiu būdu sukonstruotas gemalas įvestas įmotei (remiantis B. Mintz, 1967)



5.2 pav. **Teratokarcinomos ląstelių transplantavimas į normalią blastocistą ir normalizacija**

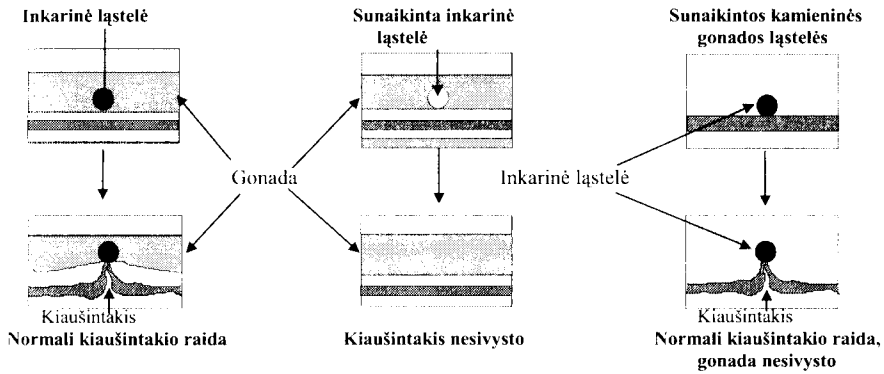
tai pašalintas branduolys, pirmiesiems oficialiai pavyko 1997 m. Edinburge Vilmutui (I. Wilmut) ir bendradarbiams. Jie klonavo avį. Žymiai anksčiau tokius tyrimus buvo atlikusi Minc (B. Mintz), bet jos tyrimų rezultatai audringai buvo ginčijami.

Minc pagarsėjo gerokai iki to kitokiais tyrimais. Dar 1967 m. ji gavo **alofenines peles**. Pradėjusiems vystytis pelių embrionams 8 ląstelių stadijoje fermentu pronaze buvo pašalinama skaidrioji zona ir ląstelės atskiriamos viena nuo kitos. Buvo sumaišytos juodų ir baltų pelių blastomeros, po to vėl perneštos į gimdą. Peliukas buvo juostuotas (5.1 pav.). Tyrimai vaizdžiai rodo, kad rezultatas priklauso nuo geno pobūdžio. Melanino genai vykdo savo programą nepriklausomai nuo kitų ląstelės genų, ir tamsi alofeninės pelės juosta yra ląstelės su melanino genu klonas.

Kitais atvejais su kitais genais ir kitomis ląstelėmis įrodyta neabejotina gretimų ląstelių įtaka. Tokie

bandymai atlikti transplantuojant teratokarcinomos ląsteles į blastocelio ertmę (5.2 pav.). **Teratokarcinomos** ląstelės – labai įdomus modelis ląstelių diferenciacijai tirti. Jos vystosi iš teratomų, o **teratomos** vystosi iš neapvaisintų ovocitų ir sudaro kamieninių ir įvairiai diferencijuotų ląstelių mišinį. Įvedus teratokarcinomos ląsteles į pelių blastocistos ertmę, teratokarcinomos ląstelės vystėsi normaliai.

Lazeris ir transplantacija. Nematodui *Caenorhabditis elegans* tirti labai sėkmingai panaudotas mikroskopas su lazerio spinduliu. Juo galima sunaikinti norimą ląstelę arba jos dalį ir po to stebėti, kaip vystysis organizmas. Tokiu būdu aptiktos ląstelės, kurios lemia/valdo gretimų ląstelių diferenciaciją. Antai viena ląstelė, pavadinta **inkarine**, nulemia kiaušintakio susidarymą. Ją sunaikinus, kiaušintakis nesivysto:



Labai dažnai atliekant onto-morfogenezės tyrimus ląstelės perkeliamos iš vienos vietos į kitą. Tai vadinamoji **ektopija** (lot. *ectopus* – ne vietoje). Rezultatas trejopas: perkeltosios ląstelės

- vystosi pagal gretimų ląstelių programą,
- keičia savo vietoje esančių ląstelių veiklą,
- vystosi pagal savo programą, gretimos ląstelės jokios įtakos joms neturi.

Taip, pvz., atsitinka, kai nematodo *C. elegans* ląstelės perkeliamos iš vienos vietos į kitą. Jos vystosi pagal savo programą. Gretimos ląstelės jokios įtakos joms neturi. Šios ląstelės jau yra **determinuotos**.

Determinuotos ląstelės jau turi savo raidos (determinacijos) programą, kurią būtų galima pakeisti tik tada, jeigu ši determinacija būtų grįžtamoji. Determinacija padaro ląstelę ir jos palikuonis kitokiais kitų gemalo ląstelių atžvilgiu ir nulemia jų raidą jau konkrečiai numatytu būdu, tik tam tikra kryptimi.

Diferenciacija vadinama ryški ląstelių specializacija, kai ląstelės akivaizdžiai skiriasi nuo kitų ląstelių.

Determinaciją ir diferenciaciją norisi lyginti su **genotipo** ir **fenotipo** sąvokomis. Determinacija – tai genetinis ląstelių potencialas, o diferenciacija – konkretus šio potencialo pasireiškimas. Genotipas apima visas genetines organizmo galimybes, o determinuotos ląstelės, nors ir funkciškai, bet „praradusios" didelę dalį genetinės informacijos. Veikia arba veiks tik tie „prabangos" genai, kurie reikalingi užprogramuotai ląstelių diferenciacijai įvykdyti.

Transdeterminacija – reiškinys, vaizdžiai įrodantis, kad ląstelių determinacija gali vykti skirtingo pobūdžio ir nevienodo laipsnio:

- grįžtamojo,
- negrįžtamojo.

Kai determinacija yra grįžtamojo pobūdžio, vietoj vieno tipo determinuotų ląstelių gali atsirasti kitaip determinuotos ląstelės – vyksta **transdeterminacija**. Šis reiškinys geriausiai ištirtas drozofiloje. Labai paranku tai, kad drozofila, kaip ir kiti vabzdžiai, patiria metamorfozę:

kiaušinėlis → lerva → lėliukė → subrendusi muselė.

Nors lerva yra kitokios sandaros negu subrendusi drozofila, bet ji turi ląstelių saleles – imaginius diskus, iš kurių vystosi konkretūs suaugėlio vabzdžio organai. Iš viso yra 19 diskų.

Imaginiai diskai yra determinuotos ląstelės. Jie labai patogūs determinacijai tirti.

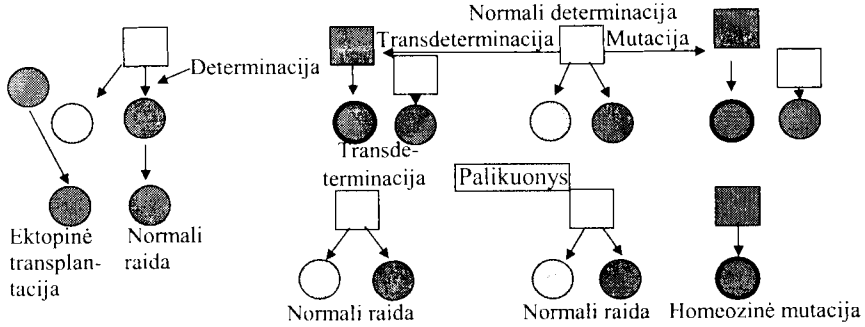
Vienas iš būdų yra transplantuoti imaginį diską į neįprastą vietą – į lervos ertmę prieš pat jai pereinant į lėliukę. Suaugėlė drozofila tokiu būdu gali įgyti papildomą organą – akį, sparną, koją ir kt. Tai tik patvirtina, kad šios ląstelės determinuotos.

Galima ir vieną imaginį diską pakeisti kitu, pvz., antenos diską pakeisti kojos disku. Vietoj antenos vystysis koja. Vadinasi, ektopinė transplantacija nepakeičia disko determinacijos pobūdžio.

Tačiau gamtoje vietoj antenos gali atsirasti koja ir pan. Tai atsitinka dėl dviejų skirtingų priežasčių:

- homeozinių mutacijų,
- transdeterminacijos.

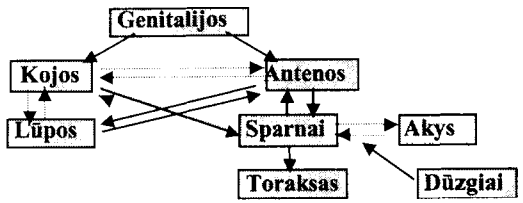
Abiem atvejais vienas imaginis diskas virsta kitu. Pakinta determinacija nuo jos atsiradimo pradžios:



Homeozinė mutacija yra tokia, kai vietoj vieno organo išsivysto kitas (pvz., kai vietoj antenos vystosi koja – mutacija *Antennapedia*). Tai pastovus paveldimas palikuonių iš kartos į kartą pokytis.

Transdeterminacija yra nepaveldimas pokytis – tai modifikacija. Ji pasireiškia tik toje kartoje, kurioje atsirado. Transdeterminacija yra daug dažnesnė negu homeozinė mutacija. Ji yra homeozinės mutacijos **fenokopija**.

Transdeterminacija vyksta tik tam tikra kryptimi:



Kai kuria kryptimi transdeterminacija būna dažnesnė. (storos rodyklės; plonos rodyklės – retai).

5.1.2. Determinacijos laikas ir vieta. Morfogenai

Determinacija – vienas svarbiausių morfogenetikos reiškinių, todėl jam skiriama daug dėmesio. Pagrindiniai klausimai yra tokie:

- kada įvyko determinacija,
- kur ji įvyko, kokiose ląstelėse ir kuriose jų dalyse,
- kokie pokyčiai įvyksta determinuotose ląstelėse,
- koks determinacijos pobūdis (grįžtamasis-negrįžtamasis, paveldimasis ar laikinasis).

Į paskutinį klausimą jau iš dalies atsakyta 5.1 poskyryje. Atsakymą į kitus klausimus komplikuoja tai, kad determinacijos laikas ir kitos ypatybės labai priklauso nuo organizmo.

Determinacijos laikas. Žmogaus bent 8-ių blastomerų embriono ląstelės nederminuotos. Determinaciją lemia tai, ar ląstelės yra išorinės (diferencijuojasi į trofoblastus), ar vidinės masės ląstelės.

Jau pirmosios dvi moliusko *Dentalium* blastomeros yra determinuotos. Atskyrus blastomeras vieną nuo kitos, iš jų vystėsi nevisavertės lervos, palyginti su tomis lervomis, kurios vystėsi iš viso kiaušinio (neatidalytų blastomerų). Skirtumai buvo dar didesni, kai blastomeros buvo atskirtos viena nuo kitos 4 ląstelių stadijoje (5.3 pav.). Taigi determinacija gilėjo laipsniškai. Tai tipiškas reiškinys.

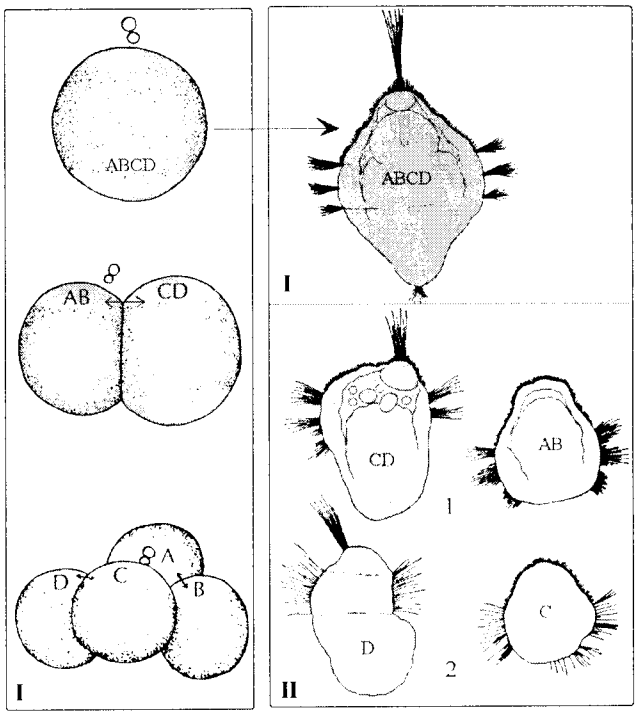
> Determinacija vyksta laipsniškai, be to, įvairiose ląstelėse ne vienu metu. Tai priklauso nuo diferencijuotų ląstelių ir organo, kuris iš šių ląstelių turėtų išsivystyti.

Nematodo *Caenorhabditis* determinacija įvyksta prieš pat pirmąjį ląstelių pasidalijimą netolygiai pasiskirstant genų produktams (žr. toliau). Taigi pirmosios ląstelės jau yra determinuotos. Be to, jos skiriasi dydžiu.

Drozofilos determinacija įvyksta dar anksčiau – neapvaisintuose ovocituose.

Kad ovocito citoplazma paskirstyta į determinuotas zonas, buvo pastebėta jau seniai, bet tiksliau tai įrodyta drozofiloms.

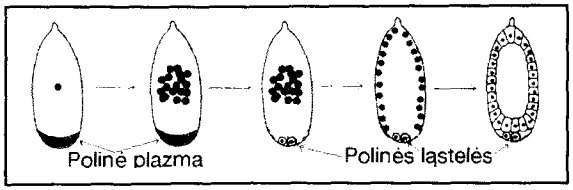
Polinė plazma. Sinsicinė blastoderma. Drozofilos raidos pradžia gerokai skiriasi nuo daugelio daugialąsčių gyvūnų. Iš pradžių dalijasi ne ląstelės, o tik branduoliai. Iš viso 9 kartus. Jie sutelkti ląstelės centre. Po to jie migruoja į periferiją, dar dalijasi. Ir tik po to vienu metu apie kiekvieną branduolį dalijasi ir citoplazma, susidaro ląstelių apvalkaliai – vyksta citokinezė. Tokia blastoderma pavadinta **sinsicine**.



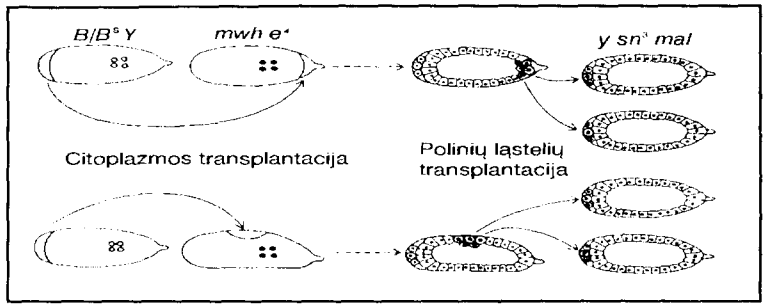
5.3 pav. **Moliusko *Dentalium* lervų raida iš atidalytų blastomerų**:
I – morfogenų (ABCD) pasiskirstymas besidalijančiame kiaušinėlyje ir normali raida; *II* – nenormali raida po blastomerų dirbtinio atidalijimo: *1* – atidalyta po 1-ojo pasidalijimo (viena lerva turėjo morfogenus CD, kita – AB); *2* – atidalyta po 2-ojo pasidalijimo (viena lerva turėjo D, kita – C)

Tačiau pastebėta, kad į užpakalinę blastocelio dalį keletas branduolių migruoja anksčiau. Apie juos citokinezė irgi įvyksta anksčiau, negu apie kitus branduolius. Šios ląstelės buvo pavadintos **polinėmis**. Iš jų vystosi gonados ir generatyvinės ląstelės (5.4 pav., *A*).

Polinės plazmos transplantacija. Polinė plazma iš vieno pradėjusio vystytis drozofilos embriono perkelta į kitą, bet neįpraston vieton. Ji injekuota į priekį arba net į šoną blastocelio, kuriame vos tik pradėjo dalytis branduoliai. Vadinasi, polinės ląstelės ir juo labiau sinsicinė blastoderma dar nebuvo susidariusios (5.4 pav., *B*). Tose embriono vietose, į kurias buvo perkelta polinė plazma, išsivystė polinės ląstelės. Akivaizdu, kad būtent citoplazma iš užpakalinės ovocito dalies lemia polinių ląstelių, o iš jų – gonadų ir generatyvinių ląstelių raidą. Būtinai reikėjo įrodyti, kad atsiradusios neįprastoje



A. Polinių ląstelių ir sinsicinės blastodermos raida

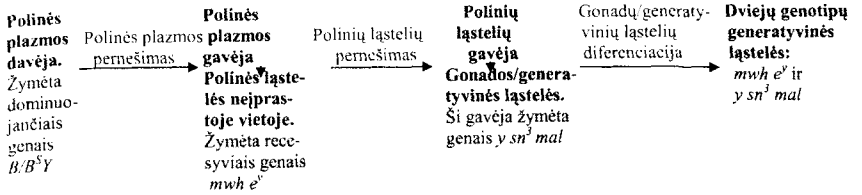


B. polinės plazmos perkėlimas į neįprastą vietą (viršuje – į priekinį galą; apačioje – į blastocelio šoną)

5.4 pav. **Drozofilos sinsicinės blastodermos bei polinių ląstelių raida ir polinės plazmos transplantacija:**
B. Drozofilos linijos žymėtos genais: **polinės plazmos donoras** *B/B^s Y* (*Bar* ir *Yellow* – normali kūno spalva). Būtina kontroliuoti, kad per klaidą nebūtų pernešta donoro branduolių. Klaidą parodytų du dominuojantys genai, kurie yra branduolyje. **Pirmasis recipientas** žymėtas recesyviaisiais genais *mwh* ir *e^v* (*multiple hair wing* ir *ebony*). Pirmojo recipiento polinės ląstelės, išsivyščiusios neįprastoje vietoje, perkeltos į antrojo recipiento blastodermos užpakalinę dalį (įprasta polinių ląstelių vieta). **Antrojo recipiento genotipas** žymėtas recesyviaisiais genais *y sn^3 mal* (*yellow*, *singed*, *marron like*). Iš kiaušinėlių išsivystė dviejų fenotipų generatyvinės ląstelės: vienų pasireiškė genai *y sn^3 mal*, kitų – *mwh e^v*. Tad dėl transplantuotos polinės plazmos susidariusios neįprastoje vietoje polinės ląstelės buvo visiškai normaliai veiklios

vietoje polinės ląstelės visiškai nesiskiria savo determinacija nuo tų polinių ląstelių, kurios susidaro užpakaliniame blastocelio gale. Tačiau suprantama, kad neįprastoje vietoje atsiradusios polinės ląstelės negali rutuliotis į gonadas. Todėl dar kartą atlikta transplantacija. Tik šįsyk neįprastoje vietoje susidariusios polinės ląstelės perkeltos į joms įprastą, normalią vietą užpakaliniame gale.

Kad nekiltų jokių abejonių dėl perkeltų ląstelių, tiek pradinė linija, iš kurios paimta polinė plazma, tiek abi linijos, kurios buvo polinės plazmos ir polinių ląstelių donorės (davėjos), tiek recipientė (gavėja), buvo žymėtos genetiškai (žr. taip pat 5.4 pav.):



Įsitikinta, kad po polinių ląstelių transplantacijos vėl į užpakalinį galą vystėsi dviejų genotipų generatyvinės ląstelės. Vadinasi, susidariusios neįprastoje vietoje polinės ląstelės yra įgijusios normalią raidos programą. Jos determinuotos vystytis į gonadas/generatyvines ląsteles, kaip ir tos polinės ląstelės, kurios susidarė įprastoje vietoje.

Taigi buvo įrodyti du svarbūs raidos reiškiniai:

- drozofilos branduolius determinuoja citoplazma; citoplazmoje esantys determinuojantys veiksniai pavadinti **morfogenais;**
- branduolių determinacija priklauso nuo vietos (pozicijos) blastocelyje, į kurią pakliūva branduoliai.

Polinė plazma determinuoja branduolius vystytis į gonadas/generatyvines ląsteles.

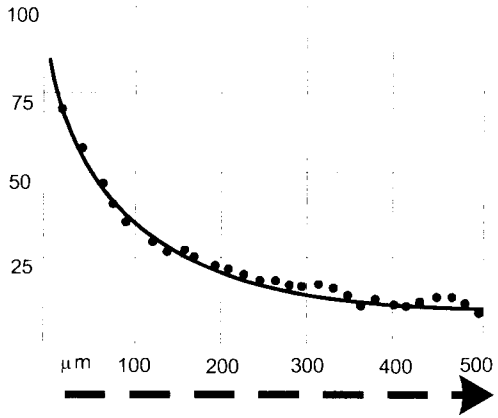
Morfogenų nereikia painioti su genais, kad ir lemiančiais morfogenezę. **Morfogenai yra baltymai, arba sudėtingas baltymų-RNR kompleksas.** Taip yra ir polinėje plazmoje, kurioje susidaro ypatingi – **poliniai kūneliai.** Į jų sudėtį, be baltymų, įeina *nanos*RNR. Ovocite pasiskirsčiusius morfogenus koduoja vadinamieji motininiai genai (žr. toliau). Jie lemia bendrą būsimojo individo planą, modelį (angl. *pattern genes*, kartais šis terminas *paterno genai* vartojamas lietuviškoje spaudoje).

Motininių genų koduojami yra, pvz., Bicoid, Hunchback (angl. *kuprius*), Nanos morfogenai. Jie lemia priekinę-užpakalinę organizmo ašį (panašūs morfogenai aptikti ir žmogaus), o morfogenas Dorsal – nugaros-pilvo (dorzalinę-ventralinę) ašį.

Morfogenų gradientai. Tiriant Bicoid ir Dorsal morfogenų pasiskirstymą po ovocitą/pradėjusį vystytis sinsicinį drozofilos blastocelį, nustatytas dar vienas esminis morfogenetikos reiškinys:

- morfogenų gradientai.

Tiek patys morfogenai, tiek jų gradientai pirmiausia buvo numatyti embriologų Špemano (H. Spemann), Čaildo (C. M. Child) dar XX šimt-



5.5 pav. ***Bicoid* morfogeno gradientas(%):** rodyklė – nuo priekinio į užpakalinį kiaušinėlio galą (visas ilgis 500 μm)

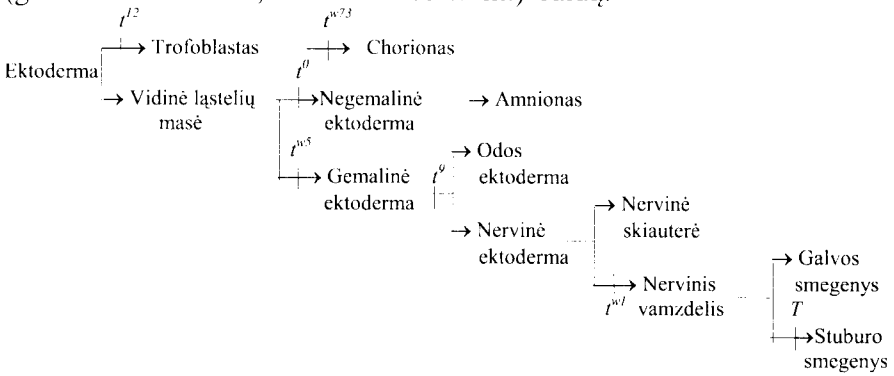
mečio pradžioje, bet įrodyti ir ištirti tik po daugelio metų Geringo (W. Gehring), Nobelio premijos laureatų Niuslein-Folhard (C. Nüsslein-Volhard), Vieschauzo (E. Wieschaus) ir kitų tyrinėtojų. Jų tyrimai tęsiami toliau.

Šiuo metu morfogenų vieta ir pasiskirstymas tiriami molekuliniais zondais – antikūnais, kurių vieta nustatoma liuminescenciniu mikroskopu *in situ* (tose ląstelėse ir tose vietose, kur jie yra). *In situ* zondais nustatyta, kad *bicoid* geno koduojamas baltymas sutelktas priekiniame ovocito/kiaušinėlio gale. Tolstant į užpakalinę dalį, jo koncentracija staigiai mažėja (5.5 pav.).

Bicoid mutanto gradientas įvairiai sutrikęs. Atitinkamai sutrikusi ir drozofilos raida. Kraštutiniu atveju pradeda vystytis lerva su dviem pilveliais, bet be galvos ir krūtinėlės (žr. 1.8 pav.). Tokia *bicoid* mutacija yra mirtina, todėl tokio tipo mutacijos pavadintos **embrioninėmis letalėmis.**

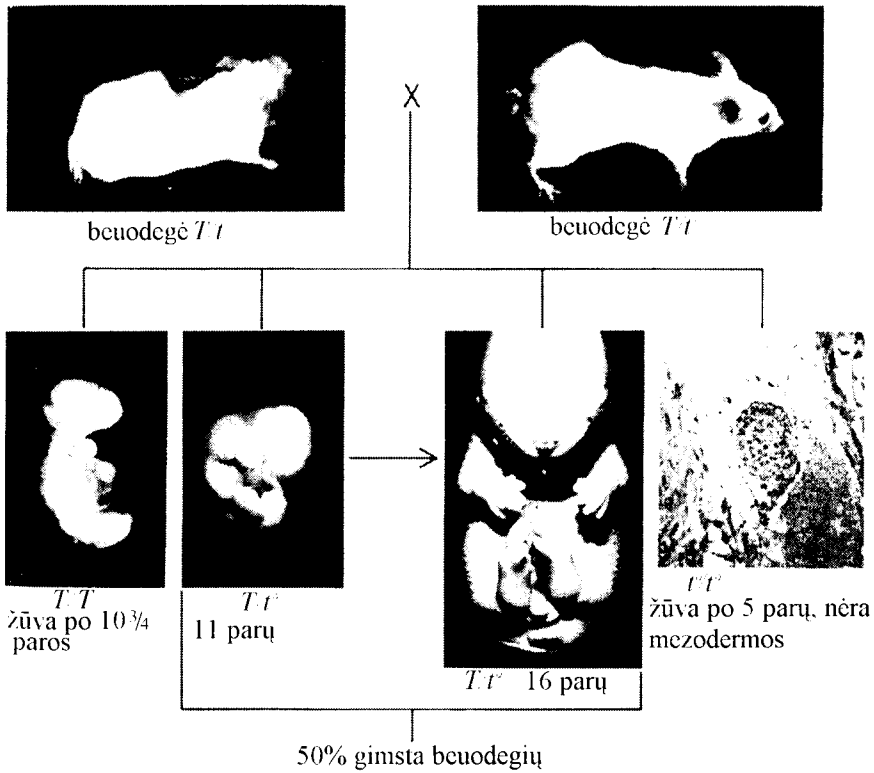
Anksčiau embrioninės letalės buvo naudojamos tik mutacijų dažniui tirti. Šiuo metu tai vienas iš svarbiausių morfogenetikos tyrimuose naudojamų mutacijų tipų. Pagal jas aptikti **ankstyvieji bendrojo plano (paterno) genai.**

Žinduolių *T/t* lokusai. Sėkmingai embrioninės letalės pritaikytos ir žinduolių morfogenetikoje. Taip aptikti *T/t* lokusai, kurie lemia (gemalo **trofoblasto, mezodermos** ir kt.) raidą:



Kartu tai yra pavyzdys kaip, atrodytų, paprasta mutacija, atidžiau ją ištyrus, lemia didelius atradimus. Šie lokusai pirmiausia aptikti pelių genome. Heterozigotinių pagal šiuos genus pelių būna trumpesnė (dažniausiai genotipas +/*t*) uodega, arba pelės visai beuodegės (genotipas *T/t*) (5.6 pav.). Homozigotos *TT* arba *tt* (įvairių alelių) yra mirtinos. Vadinasi, **gyvybingos** (kad ir „nukentėjusiomis" uodegomis) pelės yra **heterozigotos.** Tai pavyzdys **subalansuotų letalių**, kai heterozigotos gyvybingos, o homozigotos **mirtinos**.

Morfogenų susidarymo vietos nustatymas. Dar 1929 m. Startevantas (A. Sturtevant) pasiūlė būdą, kaip nustatyti vietą, kur susidaro (yra determinuojamos) ląstelės, kurios toliau rutuliojasi į imaginius diskus. Iš pradžių tai taikyta lervoms, o vėliau tyrimų rezultatai tiesiog automatiškai buvo pritaikyti daugiabranduoliam kiaušinėliui (pradėjusiam vystytis drozofilos gemalui). Bet tik 1969 m., po 40 metų,



5.6 pav. **Pelių *T/t* lokuso fenotipai sukryžminus heterozigotas *T/t*⁰** (iš E. Sinnott, L. C. Dunn, T. Dobzhansky, 1958)

šią Startevanto mintį įgyvendino Garsija-Belido (A. Garcia-Bellido) ir Meriamas (J. Merriam). Tai išties milžiniškas darbas, kuriam ne kiekvienas ryžtųsi.

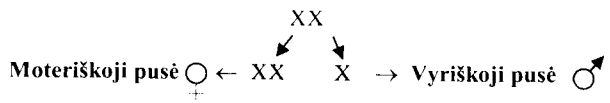
Šio metodo smulkiau nenagrinėsime. Juo nustatomas atstumas tarp trijų imaginių diskų vietų (erdviškai tai vaizduojama ne linija, ant kurios yra trys taškai, o trikampiu).

Svarbiau kitkas – dar vienas drozofilos mutacijų tipas, kuris naudojamas morfogenetikoje. Tai ginandromorfai (gr. *gyne* (*ginaikos*) – moteris + *aner* (*andros*) – vyras + *morphe* – forma).

Ginandromorfai – individai-mozaikos, kurių atskiros kūno dalys turi skirtingų lyčių kariotipą ir požymius. Būdingi tiems organizmams, kurių lytį lemia tik lytinės chromosomos, pvz., vabzdžiams.

Ginandromorfų kilmė. Moteriškąją drozofilos lytį lemia lyginis (XX), vyriškąją – nelyginis (XY arba X0) X chromosomų skaičius (žr. toliau).

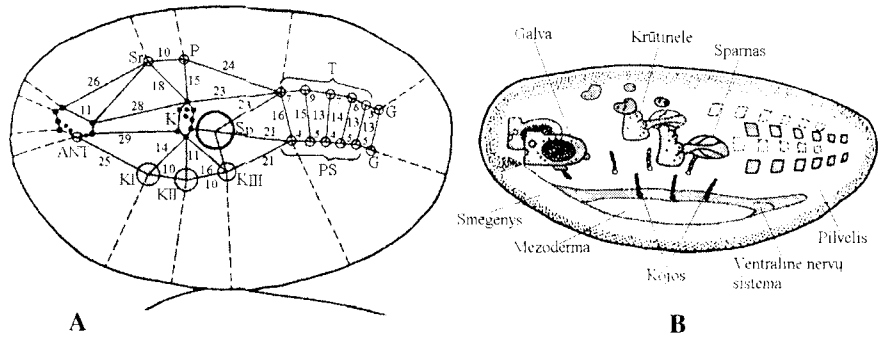
Gali atsitikti taip, kad tik pradėjus dalytis kiaušinėlio branduoliui, kuriame yra dvi X chromosomos (XX), viename iš dukterinių branduolių viena X chromosoma prarandama:



Subrendusios drozofilos kūnas šiuo konkrečiu atveju būna lygiai per pusę „padalytas“ į vyriškąją ir moteriškąją lytį.

Atsekti nedidelius „vyriškuosius“ kūno lopinėlius galima, jeigu vieną iš X chromosomų žymėsime recesyviaisiais genais, kurie kitoje chromosomoje yra dominuojantys. Tai „sukibę“ su lytimi genai, kurie yra tik X chromosomoje. Pvz., labai patogu žymėti genais *y* (*yellow* – geltonas kūnas; normali spalva, dominuojantis požymis – pilka) arba *sn* (*singed* – „nusvilinti“ šereliai, žr. 3.34 pav.).

Heterozigotinių patelių šie genai nustelbti. Jie pasireiškia tik tų ląstelių klone, kuris kilęs iš branduolio, kai jame prarasta X chromosoma su dominuojančiais genais. Vyriškojoje dalyje yra arba geltona kūno spalva, ar „nusvilę“ šereliai ir pan. Vadinasi, pagal šiuos recesyviuosius genus galima nesunkiai nustatyti vyriškąją mozaikos dalį. Mozaikos dydis priklauso nuo to, kaip anksti individo raidoje dalis ląstelių prarado X chromosomą su dominuojančiais genais.



5.7 pav. **Imaginių diskų determinacija ir vietos nustatymas drozofilos blastocelyje:** *A* – vieta, atstumas nurodytas santykiniais vienetais – stertais: ANT – antenos, KI, KII, KIII – kojų, G – gonadų, Sp – sparno, Sr – straublelio, P – peties; pilvelio skydelių: T – nugarinių (tergitų) ir PS – pilvinių (sternitų); K – krūtinėlės; *B* – kai kurių diskų „fenotipinis“ pavaizdavimas (pagal Y. Hotta, S. Benzer, 1973)

Ginandromorfai naudoti nustatyti vietoms, kuriose kaupiasi morfogenai, determinuojantys branduolius vystytis į konkrečius imaginius diskus (5.7 pav.).

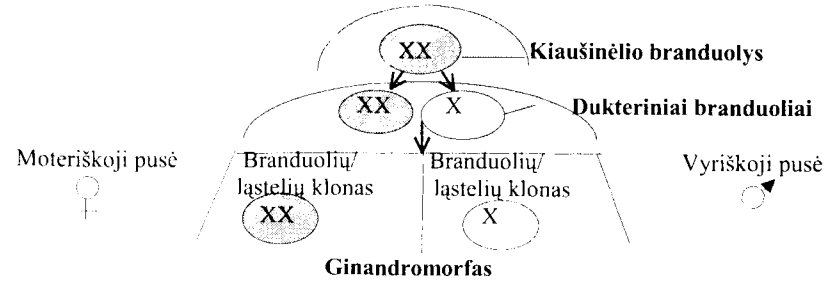
5.1.3. Pozicinė determinacija

Ginandromorfai labai įtikinamai įrodo naują esminį paveldimumo reiškinį – pozicinę determinaciją.

Pozicinė determinacija – kūno (erdvinės) sandaros raida, kurią negrįžtamai (paveldimai) nulemia genų produktų, branduolių ir kitų ląstelės struktūrų, pačių ląstelių erdvinė padėtis.

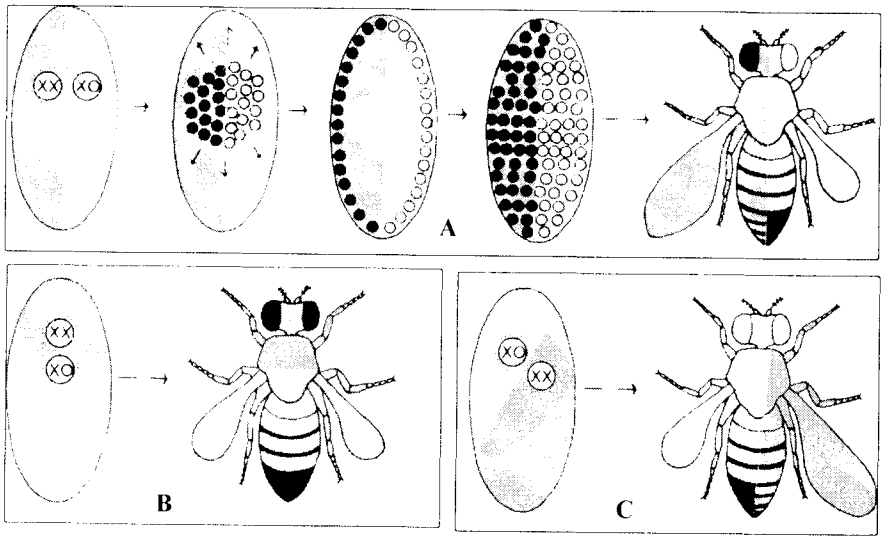
Prisiminkime du dalykus:

- **pirma**, drozofilos kiaušinėlyje branduoliai iš pradžių dalijasi 9 kartus, bet dukteriniai branduoliai neišsiskiria. Jie būna sutelkti centrinėje gemalo dalyje. Tik po to jie juda į blastocelio pakraščius;
- **antra**, kaip atsiranda mozaika – **ginandromorfas**, kurio kūnas padalytas lygiai per pusę į vyriškąją ir moteriškąją dalis: dalijantis kiaušinėlio branduoliui, kurio kariotipas XX, viename iš dukterinių branduolių prarandama viena X chromosoma. Dar kartą:



Tačiau tai dar ne viskas. Kaip bus padalytas ginandromorfo kūnas į vyriškąją ir moteriškąją dalis, priklausys nuo to, kaip išsidėsto XX ir X branduoliai gemalo centre (5.8 pav.):

- taip, kaip pavaizduota viršuje ir 5.8 pav., *A*, kūnas bus išilgai padalytas į vyriškąją ir moteriškąją lytį;



5.8 pav. **Drozofilos ginandromorfų susidarymas ir pozicinė determinacija:** tamsiau – moteriškoji kūno dalis; dukterinių branduolių padėtis po 1-ojo dalijimosi: *A* – išilgai pusiau, kairė „moteriška", dešinė – „vyriška"; *B* – skersai pusiau: viršutinė dalis „moteriška", apatinė – „vyriška", *C* – įstrižai; ginandromorfai žymėti mutacijomis *white* (baltos akys) ir *minute* (mažesni sparnai); branduoliai, kurių kariotipas XX, pavaizduoti tamsiai, o kurių kariotipas yra X (XO) – šviesiai (pagal R. A. Raff, T. C. Kaufman, 1983)

- kitais atvejais priekinė ir užpakalinė ginandromorfo dalis yra skirtingų lyčių (5.8 pav., *B*) arba kūnas padalytas per pusę, bet įkypai (5.8 pav., *C*). Akivaizdu, kad mozaikos fenotipą lemia erdvinė branduolių padėtis.

Dar įdomesnis, bet iki šiol genetikų neištirtas **pozicinės determinacijos** reiškinys – sraigės kriauklės sukimosi kryptis. Ji gali būti į dešinę ir į kairę. Nustatyta, kad tai nulemia erdvinė achromatinės verpstės padėtis per I mejozės dalijimąsi. Verpstė orientuota įkypai, gali būti nukreipta į dešinę arba į kairę. Įdomu ir tai, kad ši orientacija yra paveldima, bet priklauso nuo motinos (vėluojantysis dominavimas).

Daug pozicinės determinacijos faktų ir net priežasčių nurodyta 5.1.1 ir 5.1.2 poskyriuose:

- **drozofilos sinsicinės blastodermos branduolių determinacija** priklausomai nuo jų erdvinės padėties po branduolių migracijos į blastocelio pakraščius;
- tarp jų **polinių ląstelių determinacija**, kurią lemia polinė plazma;
- **žinduolių gemalo ląstelių** determinacija, kurią nulemia jų padėtis: išorinio sluoksnio ląstelės diferencijuojasi į **trofoblastą**, vidinės ląstelės – į **vidinės masės ląsteles** (embrioblastą).

Dažniausiai pozicinę determinaciją lemia morfogenai, kurie pasiskleidžia, sudarydami koncentracijos gradientą, t. y. vienoje vietoje morfogeno susikaupia daug, o tolstant nuo šios vietos, jo koncentracija laipsniškai mažėja.

5.2. Morfogenezės/ontogenezės genai

5.2.1. Ankstyvieji nematodo *Caenorhabditis elegans* genai. Nematodo morfo- ir ontogenetika

Konkuruojantys objektai – drozofila ir nematodas. Du žymūs virusų genetikos specialistai „kalti", kad susidomėjimas morfo- ir ontogenetikos tyrimais (nuo 1965 m. ribos) labai padidėjo. Tai Benzeris (S. Benzer) ir Breneris. Abu jie iki tol tyrė bakteriofago T_4 *rII* rajono genetinę sandarą, bet abu vieningai manė, kad tirti sudėtingų morfologinių požymių genetiką galima tik pasitelkus pakankamai sudėtingus ir kartu paprastus objektus. Benzerio ir Hotos (Y. Hotta)

1973 m. paskelbta knyga apie drozofilos morfogenezę-ontogenezę iki šiol laikoma fundamentine. Jie ne tik apibendrino išsklaidytus tyrimų rezultatus, bet ir numatė galimas tyrimų kryptis. Jos vėliau sėkmingai realizuotos.

Brenerio nuopelnas dar didesnis. Jis genetikai atrado naują objektą – nematodą *Caenorhabditis elegans*. Ši nedidukė apvalioji kirmėlė buvo žinoma nuo 1900 m., bet sistemingai ją tyrė tik belgų-prancūzų zoologas Nigonas (V. Nigon). Jo darbais ir susidomėjo Breneris.

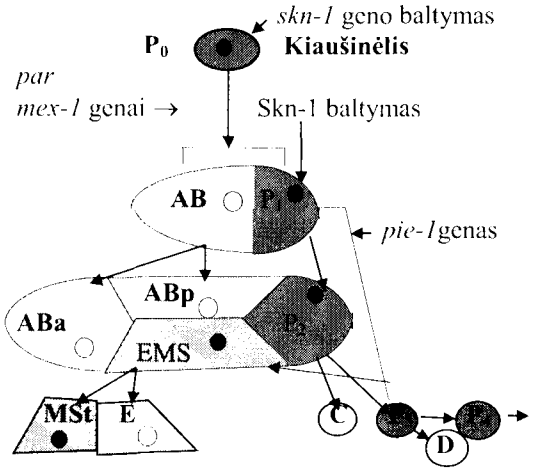
Nematodas *Caenorhabditis elegans* iš tiesų atitiko Brenerio poreikį. Jis tik 1–1,2 mm dydžio, visą nematodo raidą nuo apvaisinto kiaušinėlio iki subrendusios kirmėlytės galima tirti šviesiniu mikroskopu. Vėliau, kaip minėta, buvo pritaikytas mikroskopas su lazerio spinduliu, o dar vėliau – ir mikroskopas su vaizdo kamera (vadinamoji Nomarskio technika). Visą raidą galima įrašyti į vaizdajuostę, o po to ramiai analizuoti.

Breneriui, matyt, mieliausia širdžiai buvo tai, kad nematodai, panašiai kaip ir bakteriofagas T_4, ryja bakterijas, ir juos galima veisti ant bakterijų gazono, išauginto ant kietos mitybinės terpės Petri lėkštelėse. Nesunku reguliuoti nematodo kartas. Nematodai nusiplauna nuo kietos terpės paviršiaus vandeniu. Lieka tik kiaušinėliai – būsimoji naujoji karta.

5.9 pav. **Nematodo *Caenorhabditis elegans* hermafroditas (išorėje ir apačioje) ir patinėlis (viduje)**

Nors *C. elegans* nedidelis ir turi tik apie 1000 ląstelių (tiksliai 959), bet yra pakankamai sudėtingos sandaros (5.9 pav.) ir subrandina 1000–2000 kiaušinėlių, kurie subręsta laipsniškai. Pats apsivaisinimas ir lyties raida irgi įdomūs. Nematodai yra hermafroditai. Jų kariotipe yra dvi X chromosomos, bet kai viena iš X chormosomų prarandama, vystosi patinėlis. Įdomiausia tai, kad hermafroditas linkęs apsivaisinti (turi atitinkamą kūno sandarą) su vyriškos lyties nematodu (5.9 pav.). Todėl šie nematodai labai parankūs ir lyties genetikai tirti.

Ankstyvieji *C. elegans* genai. Nematodas pradeda vystytis dar motininėje kirmėlaitėje (5.9 pav.). Pro mikroskopą nesunku nustatyti ląstelių genealogijas, kokie organai vystosi iš pirmųjų *C. elegans* ląstelių klonų. Šiuo privalumu ir pasinaudota. Nustatyta, kad jau po pirmojo dalijimosi dukterinės ląstelės yra determinuotos (be to, jos nevienodo dydžio: **AB** stambesnė, $\mathbf{P_1}$ – smulkesnė):



AB – priekinė ektoderma,
EMS – endoderma ir priekinė mezoderma,
E – endoderma,
MSt – priekinė mezoderma,
C – užpakalinė ektoderma,
D – užpakalinė mezoderma,
$P_0 \rightarrow P_1 \rightarrow P_2 \rightarrow P_3 \rightarrow P_4$ – generatyvinis kelias,
P_4 – gonados/generatyvinės ląstelės.
Gonados/generatyvinės ląstelės

AB ląstelė yra somatinė, iš jos vystosi priekinė ektoderma (**ABa** – ryklė, hipoderma, neuronai, **ABp** – neuronai, hipoderma).

P_1 ląstelė dalijasi į somatinę **EMS** (o ši į dvi skirtingai determinuotas somatines ląsteles: **E** – iš jos vystosi žarna, ir **MS** – iš jos vystosi užpakalinė ryklės dalis, raumenys) ir **P_2**.

P_2 ląstelė dalijasi į somatinę ląstelę **C** (užpakalinė ektoderma – toliau vystosi raumenys ir hipoderma) ir **P_3**.

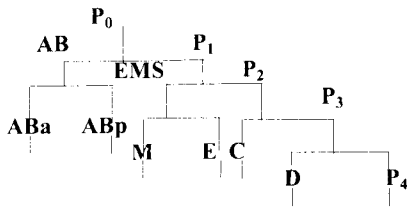
P_3 ląstelė dalijasi į somatinę ląstelę **D** (užpakalinė mezoderma – toliau vystosi raumenys) ir **P_4**.

Iš **P_4 ląstelės** vystosi tik gonados/generatyvinės ląstelės, todėl yra labai ryškus generatyvinis kelias:

$$P_0 \rightarrow P_1 \rightarrow P_2 \rightarrow P_3 \rightarrow P_4 \rightarrow \text{gonados/generatyvinės ląstelės}$$

Kiti audiniai/organai yra ląstelių „mišiniai“ (žr. toliau).

Pradinių ląstelių genealogija tokia:



Iš 2-jų ląstelių E ir P_4 toliau vystosi tik po vieną diferencijuotų ląstelių tipą/organą:

- iš *E* ląstelių – palyginti stambi žarna,
- iš P_4 ląstelių – kaip minėta, tik gonados/generatyvinės ląstelės.

Ankstyvųjų ląstelių determinacija ir ankstyvieji genai. Patogesnio objekto tarp daugialąsčių organizmų kaip šis nematodas įvairių tipų hibridizacijai *in situ* atlikti greičiausiai nėra (ši ypatybė ir pravertė nustatyti genams, kurių koduojami baltymai determinuoja ląsteles vystytis pagal $\mathbf{P_1}$ ir **AB**, $\mathbf{P_2}$ ir **EMS** ir t. t. programas).

Nustatyta, kad netolygiai paskirstomas *skn-1* geno koduojamas baltymas. Šį baltymą sintetina motinos ląstelės, todėl genas vadinamas **motininiu**. Skn-1 baltymas jau aptinkamas apvaisintuose kiaušinėliuose.

Labai svarbus vaidmuo tenka genams, kurių koduojami baltymai paskirsto Skn-1. Šie baltymai, skirstydami Skn-1, nulemia ląstelių determinaciją (ląstelių, į kurias pakliuvęs Skn-1 baltymas, branduoliai viršuje pavaizduoti tamsiai).

Genų *par-1* ir *mex-1* koduojami baltymai paskirsto Skn-1 tarp AB ir P_1 ląstelių, nukreipia Skn-1 į P_1 ląstelę. Geno *pie-1* koduojamas baltymas nukreipia Skn-1 į P_2 ir EMS ląsteles. **Skn-1 patenka į $\mathbf{P_2}$ ir EMS ląsteles, bet $\mathbf{P_2}$ ląstelėse jis nepasireiškia, jį slopina *pie-1*** koduojamas baltymas.

EMS ląstelėse Skn-1 baltymas veikia kaip morfogenas.

Įvykus, pvz., *mex-1, pie-1* mutacijoms, sutrinka Skn-1 paskirstymas ir atsiranda vieno konkretaus tipo ląstelių perteklius, o kitas apskritai nesusidaro. Pvz., sutrikus *mex-1* geno veiklai, Skn-1 gauna ir AB ląstelės. Jos irgi vystosi pagal MS programą. Mutanto *pie-1* yra žarnyno ir ryklės ląstelių perteklius, mutanto *skn-1* (angl. *skin head* – odos galva) nesusidaro nei ryklė, nei žarna.

Vėlesnėse raidos stadijose veikia kitos genų grupės. Mišriems audiniams (raumenų, neuronų) susidaryti reikalinga vieta, todėl dalis

ląstelių žūva. Taip aptikta jau minėta apoptozė (programuota ląstelių žūtis) ir genai *ced*, kurie lemia apoptozę, taip pat genai, kuria lemia suskaidytų biopolimerų („antrinių žaliavų“) panaudojimą (pvz., nukleorūgščių – genai *nuc*), o baltymams skaidyti koduojamas baltymas ubikvitinas. (Tarp kitko, ubikvitino homologas kaupiasi sergant Alheimerio liga.)

Dar yra grupė genų, kurie lemia ląstelių migraciją ir jų pastatymą į joms skirtą vietą.

5.2.2. Ankstyvieji drozofilos bendrojo plano ir segmentacijos genai

Vis dėlto drozofila iki šiol nepralenkiama. Matyt, lemia didelės mokslininkų grupės, tiriančios šią muselę, didelės mutacijų kolekcijos ir duomenų bazė, sukaupta per keletą dešimtmečių.

Ankstyvieji drozofilos genai net geriau ištirti negu nematodo. Kol kas jie skirstomi į 3 grupes:

- motininius genus,
- segmentacijos genus,
- homeozinius genus.

5.2.2.1. Motininiai genai ir jų veikla

Ne tik *C. elegans*, drozofilos, bet ir kitų organizmų raidos pradžią lemia **motinos genai**. Tai pastebėta dar tada, kai nieko nežinota apie genus. Net Linėjus (C. Linne) tvirtino, kad stambiuosius požymius lemia motina.

Po daugelio metų buvo nustatyta, kad raidos pradžioje gemalo ląstelių branduoliuose veiklūs tik motinos genai. Iš tėvo paveldėtų genų raiška prasideda vėliau. Paskui buvo aptiktas **motininis efektas** – daugelio gemalo genų veiklą gali valdyti tokie genai, kurių veiklos produktai susidaro motinos ląstelėse. Antai drozofilos X chromosomoje yra 10–15% tokių genų.

Ir tik dešimtąjį dešimtmetį hibridizacijos su zondais *in situ* metodu aptikti motinos genai, kurių veiklos produktai atlieka **ovocito determinaciją**. Šie genai pavadinti motininiais.

Motininiai yra tie **genai,** kurie veikia (ekspresuojami) motinos ląstelėse, bet reikalingi ne motinos, o bręstančio ovocito veiklai ir jo

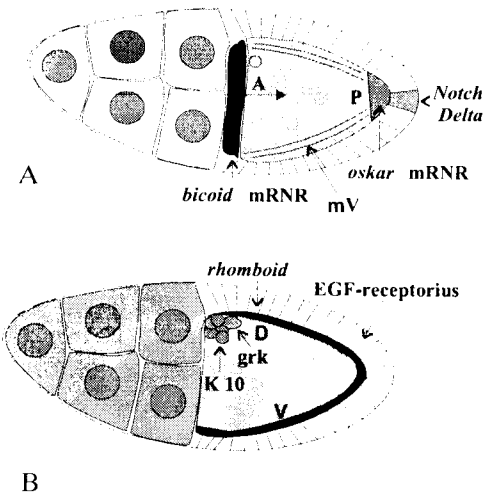
determinacijai. Tokių genų mutacijos sukelia motinos sterilumą – nesusidaro motinos lytinės ląstelės (ovocitai) arba nesivysto gemalas. Jie lemia bendrąjį būsimojo organizmo planą ir yra dviejų tipų:

- somatiniai,
- gemalinių ląstelių.

Šia fenotipine motininių genų savybe buvo remiamasi ieškant drozofilos motininių genų. Jų daugiausia aptikta tiriant paveldimai sterilias pateles (jų genetinės linijos saugomos heterozigotinėje būklėje).

Motininiai somatiniai genai veikia motinos kūno/somatinėse ląstelėse, o jų **veiklos produktai** RNR arba baltymai **gabenami į ovocitą**. Taigi reikšmingi ir tie genai, kurių produktai yra gabenami, ir tie, kurie lemia pernašą. Drozofilos tyrimais įrodyta, kad dalis motininių somatinių genų svarbūs **morfogenų pernašai ovocito viduje**. Įvairių organizmų genome šie genai gali skirtis, bet ontogenezės valdymo principas yra vienodas.

Drozofilos folikulo dalį sudaro motinos somatinės ląstelės ir 16 haploidinių ląstelių, atsiradusių po mejozės ir 2 papildomų mitozinių dalijimųsi. Iš šių 16 ląstelių tik viena yra ovocitas, o 15 yra maitinančiosios ląstelės. Motininiai genai yra veiklūs folikulo somatinėse ir maitinančiosiose ląstelėse (5.10 pav.).



5.10 pav. **Drozofilos motininiai genai:**
A – priekinės (A) – užpakalinės (P) ašies determinavimas; *B* – nugaros (D – dorzalinės) – pilvelio (V – ventralinės) ašies determinavimas

Drozofilos (ir nematodo) **motininiai genai lemia gemalo raidos kryptis/ašis**:

- priekinę,
- užpakalinę,
- galinę (terminalinę),
- nugaros-pilvo (dorzoventralinę).

Drozofilos genome jau aptikta palyginti daug motininių genų, ir jų skaičius kaskart didėja. Įsidėmėti visus šiuos genus nėra jokios prasmės. Čia pateikiame kai kuriuos iš šių genų, kad įsivaizduoti, kaip sudėtingai paveldimas bendras kūno planas:

Ašys→ / Genų grupės ↓	Priekinė	Užpakalinė	Galinė	Nugaros-pilvo
Motininiai somatiniai	*Notch* *Delta*		*torsolike*	*Eqfr* *rhomboid* *GAP1* *pipe* *nudel* *windbeutel*
Motininiai gemaliniai	*exuperantia* *swallow* *staufen* ***bicoid***	*capuccino* *spire* ***staufen*** ***oskar*** ***vasa*** *valois* *tudor* *magonashi* ***nanos*** *pumilio* ***hunchback***	*trunk* ***torso*** *polehole*	*K10* *capuccino* *spire* *cornichon* *gurken* *easter* *snake* *spätzle* *gastrulation-* *-defective* ***Toll*** *tube* *pelle* *cactus* ***dorsal***

Be to, šiuos genus turi papildyti tie, kurie koduoja judėjimo (motorinius) baltymus ir mikrovamzdelius, nes šie perneša motininių somatinių ir motininių gemalinių genų produktus į vietą. Savo ruožtu kai kurie motininiai genai (pvz., *nanos, capuccino, spire, Notch, Delta*) lemia mikrovamzdelių ašį, kuria vyksta pernaša. Viršuje tamsiai išskirti tie genai, kurie koduoja morfogenus, nors, kaip minėta, jie gali būti ir baltymų-RNR kompleksai (žr. polinė plazma).

Be to, daugelio morfogenų nusistovi gradientai. Tai net pateikiama kaip viena iš pagrindinių morfogenų ypatybių.

5.2.2.2. Drozofilos segmentacijos ir homeoziniai genai. HOM kompleksas

Visų vabzdžių kūnas sudarytas iš segmentų. Drozofilos kūnas susideda iš 14 segmentų (5.11 pav.):

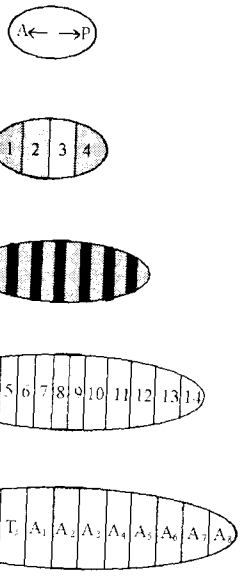
C 1–3 – galvos segmentai,
T 1–3 – krūtinėlės (torakso) segmentai,
A 1–8 – pilvelio segmentai.

Šis požymis patogus tirti, nes ryški jau lervų segmentacija, tačiau paveldima kiek kitaip – **parasegmentais** („kad nepasimestų"). Parasegementą sudaro vieno segmento pabaiga ir kito pradžia, pvz., T_{1p}–T_{2a}, arba A_{2p}–A_{3a} ir pan. (p – lot. *posterior* – po; a – nuo *anterior* – prieš).

Tačiau pati drozofilos segmentacijos genetika prasidėjo nuo kito galo – nuo homeozinių genų, kurie iš tikrųjų veikia paskutinėje stadijoje, diferencijuodami segmentus.

Segmentaciją lemia bent 5 genų grupės, veikiančios viena paskui kitą:

- **motininiai genai** lemia priekinę ir užpakalinę dalį ir valdo kitų hierarchijų genus;
- ***gap*** (angl. tarpas) **genai**, dėl kurių kiaušinėlis dalijasi į 4 plačias juostas;
- ***pair-rule*** **genai**, dėl kurių gemalas dalijasi į 7 juostas kas antrą segmentą; iš čia šių genų pavadinimas – porinės taisyklės genai;
- **segmentų poliškumo genai**, dėl kurių gemalo kūnas padalijamas į 14 segmentų;
- **homeoziniai genai** (arba *selector* genai – surinkėjai), kurių produktai konkrečius segmentus diferencijuoja į, pvz., T_{1p}–T_{2a}, A_{2p}–A_{3a} ir pan.

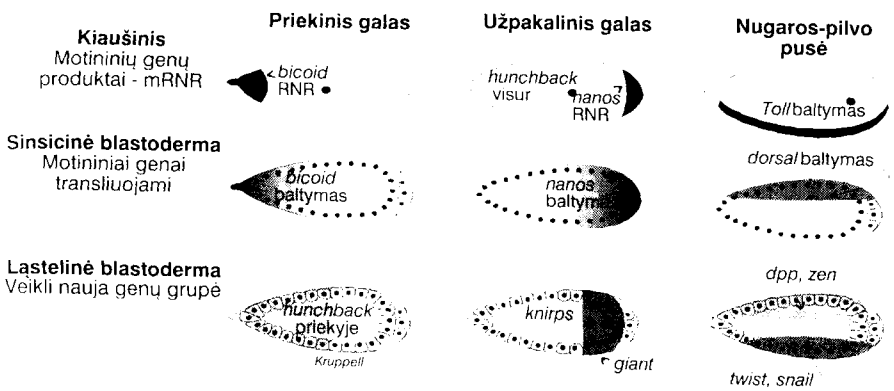


Visų grupių genai valdomi pagal vieną principą:

žemesnės pakopos (kaskados) genus valdo aukštesnės pakopos genai, taip pat patys save valdo. *Gap* genus valdo motininis *bicoid* genas, taip pat jie valdo vienas kitą:

- pats priekinis galas turi Hunchback baltymą,
- Hunchback baltymas aktyvina *Krüppell* geną,
- kitos dvi juostos atitinkamai turi *knirps* ir *giant* genų koduojamus baltymus.

Šie du genai pasireiškia tik užpakaliniame gale. Kito motininio *nanos* geno koduojamas baltymas. Nanos (morfogenas) yra užpakaliniame gale ir slopina *hunchback* veiklą šioje dalyje:



Visi ***gap*** **genai**/jų koduojami baltymai valdo ***pair-rule*** **genus**. Šie koduoja kas antrą segmentą. Įdomu tai, kad yra dvi *pair-rule* genų grupės. Viena jų lemia 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 segmentus, kita – 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 segmentus.

Pagaliau yra genai, dėl kurių veiklos visas drozofilos kūnas dalijamas į 14 segmentų ir net priekinę-užpakalinę segmento dalį. Įdomios šių genų mutacijos. Pvz., gali būti prarandama parasegmento užpakalinė P dalis, o vietoj jos atsiranda priekinė dalis A, bet kaip veidrodyje – atvirkščias vaizdas.

Genų *gap* arba *pair-rule* mutacijos yra letalios, panašiai kaip motininių genų mutacijos.

Kai pagaliau drozofilos lervos kūnas suskirstytas į visus 14 segmentų, pradeda veikti kita grupė genų, vadinamų **selektoriais**, arba **homeoziniais genais**. Ši genų grupė lemia segmentų (tiksliau, imaginių diskų) diferenciaciją:

- 1–3 segmentai virsta C_1–C_3,
- 4–6 segmentai – T_1–T_3,
- 7–14 segmentai – A_1–A_8.

Šie genai selektoriais pavadinti todėl, kad jie lyg surenka į krūvą visus genus, lemiančius tuos organus, kurie yra konkrečiame segmente arba ant jo (pvz., ant sparnų, antenos, nervų arba virškinimo sistemų

ir kt.). Suprantama, kiekvieną organą lemia konkreti genų grupė. Keletas tokių genų grupių jau gerai ištirtos.

***HOM* kompleksas. Homeoziniai genai.** Homeozinių genų irgi yra 3–4 grupės, bet nagrinėsime tik dvi, jungiamas į vieną bendrą ***HOM* kompleksą** (pavadinimas kilęs iš homeozinių mutantų). Ši genų grupė ištirta geriausiai. Jai būdinga **kaskadinė sandara ir veikla**: *HOM* kompleksas sudarytas iš dviejų genų sankaupų *ANT-C* ir *BX-C*, gana artimai esančių 3-iojoje drozofilos chromosomoje, o šios dvi sankaupos dalijamos iki konkrečių genų:

HOM kompleksas – 3-ioji chromosoma

84A–B ***ANT–C*** (~350 kb) §§ 89E 1–4 ***BX–C*** (~300 kb)

lab pb zen bcd ama Dfd Scr ftz Antp — ***Ubx AbdA AbdB***

Iš **ANT-C** genų grupės įdomiausias yra *Antp*. Jis pats didžiausias – 103 kb, turi 8 egzonus, bet tik 1% viso geno koduoja baltymą (43 kDa). Atviras skaitymo rėmelis (t. y. baltymą koduojanti nukleotidų seka) yra tik 5-ajame egzone. Genas turi tris labai didelius intronus ir du promotorius: vieną 1-ajame egzone, o kitą – prieš 3-iąjį egzoną. Promotoriai nutolę vienas nuo kito net per 70 kb.

Prisiminkime ta proga, kad egzonai – transkribuojamos genų nukleotidų sekos, kurios išlieka ir po splaisingo. Kokia paskirtis šių išlikusių RNR sekų, kurias lemia netransliuojami egzonai, kol kas nenustatyta, bet tai labiausiai domina šio geno tyrinėtojus. Be to, įdomu, kad ir alternatyvusis splaisingas vyksta geno dalyje iki 5-ojo egzono, t. y. netransliuojamoje geno dalyje.

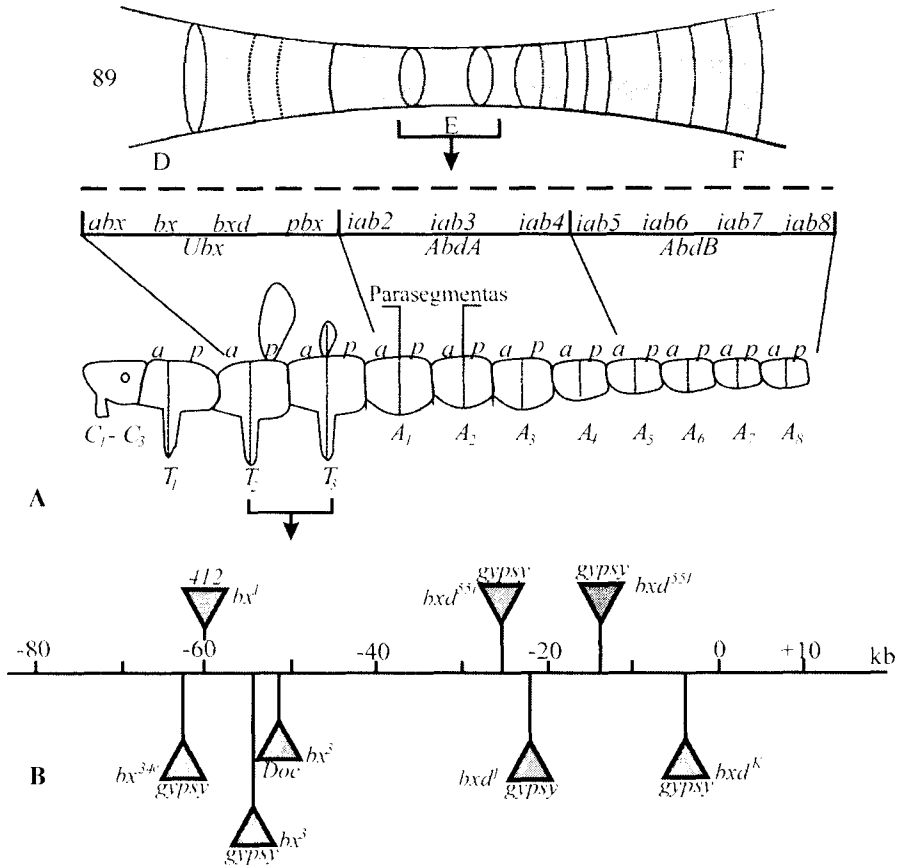
***BX-C* kompleksas** (5.11 pav.). Smulkiau nagrinėsime šią *HOM* komplekso dalį, nes joje labai ryški kaskadinė sandara ir veiklos valdymas. Šis kompleksas diferencijuoja drozofilos kūno dalį nuo T_{2p} iki pat galo – A_8 segmento, ir jame yra apie 20 genų. *BX-C* kompleksas dalijamas į tris dalis:

BX–C

Ubx (T_{2p}–A_{1a})	*AbdA* (A_{1p}–A_4)	*AbdB* (A_5–A_8)
cbx abx bx bxd pbx	*iab2 iab3 iab4*	*iab5 iab6 iab7 iab8*

Nuo vienos ir kitos dalių transkribuojama po bendrą preRNR, kuri, jai brėstant, suskaidoma į atskiras RNR (panašiai kaip 5S rRNR). Įdomu tai, kad *bxd* koduoja RNR (ne baltymą). Šių nedidelių (4,7 kb, 3,2 kb ir 4,3 kb) RNR funkcija kol kas nenustatyta, bet genų mutacijos irgi yra *bithorax* tipo.

Jeigu įvyksta *BX-C* delecija, visi segmentai *Antp*. Konkrečių genų mutacijos paverčia vieną segmentą kitu.



5.11 pav. **Drozofilos *BX-C* ir judriųjų genomo elementų įsiterpimo vietos į *Ubx* lokusą**

5.2.3. Morfogenezės genų veikla. *HOX* genai žmogaus/žinduolių ir kitų organizmų genome

„Kam mums tie drozofilos genai?“ – toks klausimas kilo ne vienam, studijavusiam prieš tai buvusius poskyrius. Neskubėkime „teisti“ drozofilos dėl to, kad turi tiek daug morfogenezės genų.

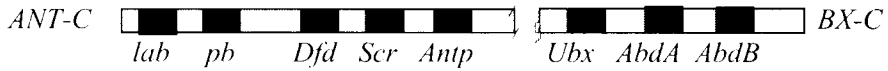
Daugelio organizmų, esančių visiškai skirtingose pagal sudėtingumą ir morfologinę kūno sandarą pakopose, individuali raida ir morfogenezė lemiama tų pačių (homologinių) genų.

Užbėgant šiek tiek į priekį reikia pasakyti, kad drozofilos homeozinių genų homologai yra ir nematodo *Caenorhabditis elegans*, ir žinduolių, ir net augalų bei mielių genome. Žinduolių genome jie koduoja tą pačią priekinę-užpakalinę ašį.

Homologija tarp žinduolių ir drozofilos homeozinių genų tokia didelė, kad, ektopiškai perkėlus pelės *Hox D4* ir *Hox B6* genus į drozofilos genomą, šie perkelti genai veikė kaip „natūralūs" drozofilos *Dfd* ir *Antp* genai.

Homeo* nukleotidų seka ir homeodomenas**. Šveicarijos mokslininkas Geringas (W. J. Gering) ne tik smulkiai ištyrė drozofilos segmentacijos genetiką, bet ir atrado *homeo* genus. ***Homeo* genai** yra tokie, kurių 3′ gale yra 180 n. p. ilgio specifinė nukleotidų seka. Pasitaikė taip, kad pirmieji genai, kuriuose aptikta ši seka, buvo homeoziniai. Iš čia kilo šios sekos pavadinimas ***homeo. Iš tikrųjų, *homeo* seką turi ne visi homeoziniai genai. *Homeo* seka aptikta 5-iuose *ANT-C* genuose ir 3-juose *BX-C* genuose. Ji aptikta ir kitų grupių morfogenezės genuose. Antai ją turi motininis genas *bicoid*. Drozofilos genome jau aptikta apie 40 *homeo* genų.

Reikia atkreipti dėmesį į tai, kad *HOM-C* komplekse *homeo* genų pasiskirstymas yra toks, kad jie „apima" visą drozofilos ilgį:



Homeo genai – transkripcijos veiksniai. Dar prieš atrandant *homeo* seką buvo aišku, kad homeoziniai genai yra valdymo genai. Kai kurie jų valdo šimtus genų. Tad ir atradus *homeo* seką homeoziniuose genuose, ši seka iš karto buvo siejama su valdymo funkcija. Tačiau nustebino šios sekos padėtis. Įprasta, kad valdymo sekos būtų geno 5′ gale. O *homeo* seka buvo aptinkama 3′ gale, t. y. tame gale, kuris yra transkribuojamas. Be to, *homeo* seka akivaizdžiai buvo skaitymo rėmelis, vadinasi, koduojantis baltymą. Ir iš tikrųjų netrukus buvo nustatyta, kad *homeo* seka koduoja polipeptidą, kuris atitinkamai buvo pavadintas **homeodomenu**.

Paaiškėjo ir šio polipeptido funkcija. Jis yra **HTH** („*helix-turn-helix* = spiralė-posūkis-spiralė") tipo transkripcijos veiksnys, sugebantis jungtis su DNR.

> ***Homeo*** genai koduoja transkripcijos veiksnius. Jie homeodomenu jungiasi su tais genais, kurių veiklą valdo ir kurie turi atitinkamas atpažinimo sekas.

Žmogaus *HOX* genai. Didžiausia staigmena laukė, kai molekuliniu zondu (homeo sekos kopija) *homeo* genai aptikti žinduolių, tarp jų ir žmogaus genome. Vėliau *homeo* genai buvo aptikti nematodo *Caenorhabditis elegans*, net augalų genome. Įdomiausia, kad jie yra ir vienaląsčių eukariotų mielių genome *α2* gene, kuris lemia vieną iš mielių poravimosi tipų (žr. p. 219), o per jį ir esminius mielių raidos poslinkius.

Žinduolių genome atrandami vis nauji *homeo* genai. Jie vadinami kitaip:

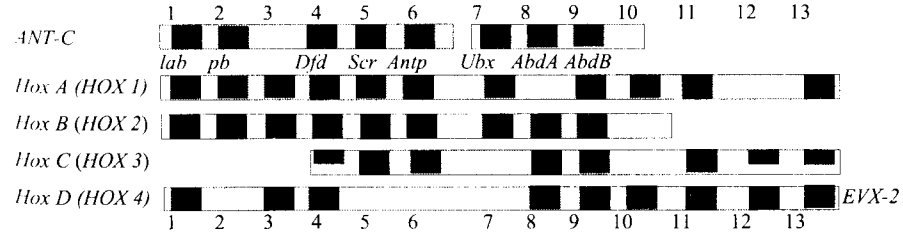
- žmogaus – *HOX – 1, 2, 3...*
- pelės – *Hox – A, B, C...*

Drozofilos *homeo* genai (tiksliau, jų dalis) sutelkti į sankaupas (*ANT-C* ir *BX-C*). Žmogaus genome aptiktos keturios *HOX* genų sankaupos, lokalizuotos skirtingose chromosomose:

HOX-1 – vieta 7p14–p21, ilgis >100 kb, genų – 13,
HOX-2 – vieta 17q11v–q22, ilgis 180 kb, genų – 9,
HOX-3 – vieta 12q11–q21, ilgis 160 kb, genų – 7,
HOX-4 – vieta 2q31–q37, ilgis 70 kb, genų – 6.

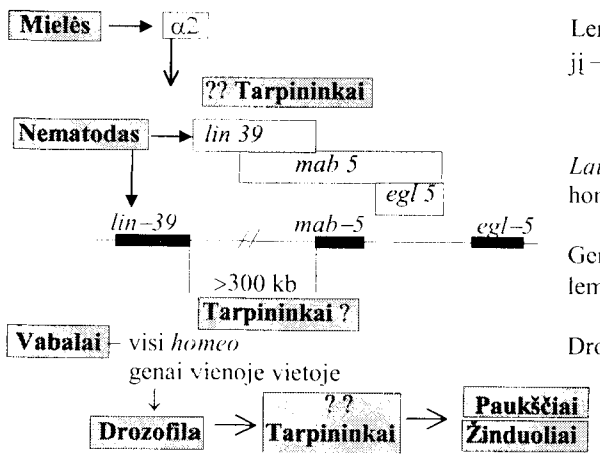
Be to, nustatyta apie 10 lokusų įvairiose chromosomose, kuriose yra pavienių *HOX* genų (atrandami vis nauji *HOX* genai).

Žmogaus ir pelės genome, visose 4 genų sankaupose, aptikta ir papildomų *homeo* genų, nehomologinių likusiąja dalimi drozofilos genams. Pvz., *HOX-1* sankaupoje tokie yra 4 genai, *HOX-3* sankaupoje – 3 genai, *HOX-4* – 4 genai. Šie naujieji genai yra daugiau ar mažiau homologiški vienas kitam:



***Homeo* genų lyginamoji genetika/evoliucija** yra nepakankamai ištirta. Kol kas nenustatytas archaiškiausias *homeo* genas. Kaip minėta, žemiausios pakopos organizmai, kuriuose aptikta *homeo* genų, yra mielės, bet gal yra primityvesnių organizmų.

Akivaizdu, kad stiprėjo genų paskirtis nulemti priekinę-užpakalinę būsimojo individo ašį:



Lemia poravimosi tipą, per jį – ląstelių dalijimąsi

Laipteliais pavaizduota genų homologija

Genolapis/užuomazga, lemia ventralinę ektodermą

Drozofilos *ANT-C* ir *BX-C* (?)

Kelios genų sankaupos

Mielių genome šių genų pradžia lėmė poravimosi tipus, su kuriais susijusi mielių raida ir ląstelių dalijimasis. Nematodo *homeo* genai jau lemia morfologiją, bet jų reikšmė dar nedidelė. Jie lemia ventralinę ektodermą. Drozofilos *homeo* genai jau lemia priekinę-užpakalinę ašį ir konkrečių segmentų diferenciaciją, panašiai, kaip žinduolių *HOX* genai.

Žinduolių *homeo* genai yra tos pačios paskirties, kaip ir drozofilos genome:

- lemia priekinę-užpakalinę ašį,
- segmentuotų organų/struktūrų raidą,
- bet atsiranda ir naujų funkcijų, tiksliau, jos modifikuotos, pritaikytos sudėtingai organizmo sandarai.

Žmogaus genome *HOX* genai, be priekinės-užpakalinės ašies, lemia stuburo segmentų ir, svarbiausia, smegenų skyrių raidą: priekinių (tik iš dalies), tarpinių (kiti morfogenezės genai – *EN*, *PAX;* pastarasis turi ir *homeo* seką), užpakalinių smegenų, nervinio vamzdelio; organų raidą: *PAX-1* – skeleto, *PAX-6*, *HOX-10* – akies, *GAX* – širdies, lygiųjų ir skeleto raumenų ir kt. Atrandami vis nauji genai. *Homeo* genai – ne vienintelė žmogaus morfogenezės genų grupė, kurios veikla šiuo metu ištirta.

5.1 lentelė. **Kai kurie žmogaus įgimti defektai ir raidos sutrikimai (displazijos) dėl mutacijų genuose, homologiniuose drozofilos segmentacijos genams**

Drozofilos genai	Žmogaus genai	Ypatybės
paired	*PAX*	Devyni artimai sukibę genai – *PAX3, PAX6, PAX7* papildomai turi *homeo* seką
	PAX 2	Optinė koloboma (plyšys), inkstų displazija, vezikuloureteralinis susiliejimas
	PAX 6/AN 2	Aniridija (rainelės nebuvimas – heterozigotose): *anophthalmia* (beakystė – homozigotose)
	PAX3, 7 – FKHR	Alveolinė rabdomiosarkoma, daugybiniai pokyčiai su glaukoma, genas lemia priekinę akies dalį, nervinio vamzdelio raidą, inkstų raidą
	PAX8 (2q12-14)	Tiroidospecifinis transkripcijos veiksnys, sutrikusi skydliaukės raida
	WS (Waardenburgo sindromai)	
	PAX3/WS I (2q35-36)	Kurtumas, *dystopia* (organo buvimas neįprastoje vietoje), *canthorum* (plačiai išplėstos akys), pigmentacijos sutrikimai
	WS III	WS I su komptodaktilija (sutraukti pirštai), ne vietoje didysis pirštas, galūnių raidos sutrikimai
homeo	*TCR-Hox11* translokacija	T ląstelių leukozė
	E2A-PBX	Ūmi limfoblastų leukozė
	*MNF-1*a (12q)	MODY3 anksti pasireiškiantis, susijęs su brendimu diabetas
	IPF-1	MODY4 papildomai – kasos agenezė
	HOX-4A	Sutrikusi kraujo gamyba
	HOX-10	Retinos raidos defektai
	HOX-7	Volfo-Hiršhorno sindromas (delecija 4p16.1-)
	HOX 1-4	Skeleto ir smegenų raidos sutrikimai, letalūs pokyčiai
msh-homeo	*MSX 2* (5q34-35)	*Craniosynostosis* (priešlaikinis kaukolės siūlių suaugimas), Bostono tipas
	MSX1 (4p16.36.1)	Galūnių raidos sutrikimai
POU-homeo	*POU3 F4/DNF 3*	„Sukibęs" su lytimi kurtumas (ausies kaulelio padėtis, nenormalus akustinio kanalo išsiplėtimas)
	PIT-1	Sutrikusi hipofizio veikla
bicoid-homeo	*PTX-1*	Riego sindromas, hipofizio raidos sutrikimai
even-skipped-homeo	*EVX2*(2q24.3-31)	Galūnių raidos sutrikimai
wingless	*WNT3*(17q21-22)	Galūnių raidos sutrikimai
	WNT2(17q31)	
	WNT1(12q13)	
Kruppel	*GLI – 3*(7p13)	Greigo cefalopolisindaktilija, glioblastoma (agresyviausias smegenų vėžys)
engrailed	*EN2*(7q36)	Galūnių raidos sutrikimai

Morfogenezės genai koduoja labai įvairius baltymus – nuo transmembraninių receptorių, signalo pernašos ir šaperonų tipo baltymų iki įvairiausių tipų transkripcijos veiksnių. Antai

- *paired* (jį turintys žmogaus genai žymimi *PAX*, koduoja 128 a. r. polipeptidą),
- 3 *gap* genai (*hb*, *Kr*, *kni*) – cinko „pirštelių" motyvą,
- *giant* – leucino „užtrauktuko" motyvą,
- *fushi tarazu*, *tailless* – hormonų receptorius.

Kai kurie tiek drozofilos, tiek žmogaus genai turi abu – *homeo* ir *paired* koduojančius domenus. Pvz., tokie yra drozofilos *goosberry*, *even-skipped* genai.

***HOX/PAX* genų mutacijos – žmogaus paveldimos ligos**. Vis daugiau įrodoma ligų, kurių priežastis yra morfogenezės genų mutacijos (5.1 lentelė). Suprantama, didžioji dalis morfogenezės genų mutacijų yra letalios ir pasišalina ankstyvoje embriogenezėje. Jos neaptinkamos dabartiniais metodais.

Įdomios dvi *homeo* genų sandaros ypatybės:

- daugelis drozofilos homeozinių ir segmentacijos genų turi paprastąsias kartotines sekas, vadinasi, tose vietose gali atsirasti mikrosatelitai;
- *ANT-C* ir *BX-C* yra labai daug judriųjų genomo elementų įsiterpimo vietų (5.11 pav.). Tai gali lemti didelį šių genų kintamumą. Kam tai reikalinga, koks tokios genų sandaros tikslingumas, iki šiol neaišku.

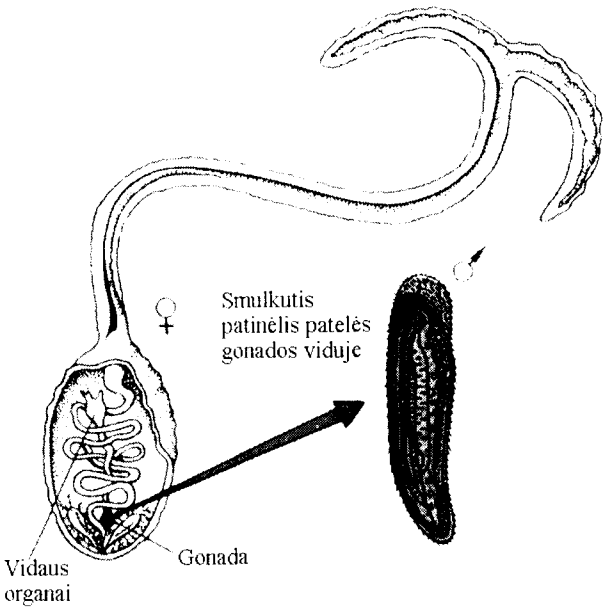
5.3. Lyties genetika

Istoriškai **lyties genetika – vienas pirmųjų morfogenetikos modelių**. Tie organizmai, kurių **lytinis dimorfizmas** labai ryškus, per palyginti trumpą laiką to paties genomo bazėje patiria labai skirtingą raidą. Ir tai negali nedominti morfogenetikos specialistų.

Lyties raida dažniausiai pagrįsta alternatyva „arba–arba", nors yra ir tokių organizmų, kurių yra keli lytiniai (poravimosi) tipai.

Vieną lytį galima prilyginti nuliniam variantui, o nukrypimas į kitą lytį, raida ta kryptimi yra antstatas, rodantis, kiek pažengta nuo nulinio varianto. Šis principas yra pamatinis, nes lytis nulemiama labai įvairiai.

Lyties raidos valdymo įvairovė. Eukariotų lytis lemiama labai įvairiai. Bene paprasčiausias būdas – specialiais genais, kurie lemia vyriškąją arba moteriškąją lytį, kaip raudonuogės brienės (*Brionia dioica*). Kitų organizmų, kaip augalo *Arisaema japonica*, jūrų kirmėlės *Bonellia viridis* (5.12 pav.), dvinamio asiūklio, lytis priklauso nuo aplinkos, nors tokią priklausomybę nulemia genai. Progaminis (gr. *pro* – iki, *gamos* – santuoka) lyties nulėmimas yra retas reiškinys ir priklauso nuo asimetrinės mitozės (susidaro stambūs ir smulkūs ovocitai: po apvaisinimo iš stambių ovocitų vystosi moteriškosios lyties organizmai, iš smulkių – vyriškosios) ir valdymo genų, kurie reguliuoja ovocitų augimą: vieni ovocitai auga lėtai, kiti – sparčiai. Daugelio organizmų (kai kurių pirmuonių, taip pat prokariotų – bakterijų) lytį lemia nebranduoliniai paveldimumo vienetai. Šie organizmai skirstomi ne į moteriškąją ir vyriškąją lytį, o į poravimosi (lytinius) tipus, kurių gali būti labai daug. Tipo



5.12 pav. **Jūrų kirmėlės *Bonellia viridis* patelė ir patinėlis**

viduje organizmai nesiporuoja. Lytinis procesas vyksta tarp tam tikrų arba bet kurių lytinių tipų. Tai būdinga ir grybams, dumbliams.

Bakterijų (žr. p. 540) ir mielių (žr. p. 219) poravimosi (lytinių) tipų genetika pakankamai smulkiai aptarta. Šiame skyrelyje daugiau dėmesio skiriama gyvūnų – aukštesniųjų eukariotų lyties genetikai.

Daugumos eukariotų lytis priklauso nuo zigotų genetinių savybių. Toks reiškinys vadinamas **singamija** (gr. *syngamos* – sujungti santuoka). Dažnai šias savybes lemia specialios lytinės chromosomos, jų skaičius, balansas. Pagal tai, kaip chromosomos lemia lytį, skiriama daug tipų. Tačiau nepaisant jų įvairovės dažniausiai lyties paveldėjimas formaliai atitinka analizuojančiuosius kryžminimus (t. y. lyčių santykis yra 1:1). Viena lytis yra **homogametinė** (susidaro tik vieno tipo lytinės ląstelės), antra – **heterogametinė** (susidaro dviejų tipų lytinės ląstelės). Jų galimos įvairios variacijos.

Diploidija (mot.) – haploidija (vyr.). Šis lytį sąlygojantis tipas dažnas tarp vabzdžių *Hymenoptera*; jis būdingas skruzdėlėms, bitėms, širšėms. Dalis kiaušinėlių apvaisinami, ir iš jų vystosi moteriškosios lyties palikuonys, o dalis lieka neapvaisintų, ir iš jų vystosi patinėliai. Patinėliuose mejozė nevyksta, spermatozoidai formuojasi vykstant mitozei. Tačiau haploidinės yra tik patinėlio generatyvinės ląstelės, o somatinės ląstelės dėl endomitozės turi diploidinį chromosomų skaičių, todėl patinėliai yra visiškai gyvybingi (paprastai dėl haploidijos mažėja gyvybingumas).

XX (mot.) – XO (vyr.) tipas (heterogametinė vyriškoji lytis, pusė vyriškų lytinių ląstelių turi X chromosomą, kita pusė jos neturi). Jis būdingas kai kuriems vabzdžiams (žiogui, blakei *Protenor*). Labai savotiškai reguliuojama kai kurių vabzdžių (amarų) lytis. Jiems būdinga ciklinė partenogenezė: vasarą dauginasi partenogenetiškai, rudenį – lytiniu būdu. Rudenėjant išsivysto vadinamosios **seksuoporinės patelės**, kurių palikuonys yra vyriškosios lyties, nes prarandama viena X chromosoma. Patinėlio spermatozoidai vystosi tik iš tų ląstelių, kurios turi X chromosomą. Ląstelės be X chromosomos sunyksta, todėl po apsivaisinimo vėl išsivysto tik patelės (XX).

XY (mot.) – XX (vyr.) arba XO (mot.) – XX (vyr.) tipai (heterogametinė moteriškoji lytis) būdingi drugiams, paukščiams, žuvims ir kt. Kai kuriose sisteminėse grupėse (vabzdžiai, žuvys, amfibijos, žiediniai augalai) pasitaiko rūšių su vyrišku heterogametiškumu ir rūšių su moterišku heterogametiškumu. Aptinkama rūšių ir su daugiau kaip dviem lytinėmis chromosomomis (ir X, ir Y). Manoma, kad lytį nulemia tik viena jų pora, o kitos yra papildomos.

XX(mot.) – XY (vyr.) – tipas (heterogametinė yra vyriškoji lytis). Taip nulemiama drozofilos ir žmogaus lytis, bet tik formaliai. Skirtumas išryškėja tiriant individus su anomaliniu lytinių chromosomų skaičiumi. **Drozofilos** lytis daugiausia priklauso nuo to, ar **X chromosomų skaičius lyginis** (patelė), ar **nelyginis** (patinėlis):

XX, XXXX, XXY, XXYY (mot.)
X, XY, XYY, XXX, XXXY (vyr.)

X chromosomų ir autosomų balansas. Prisiminkime, kad nelytinės chromosomos vadinamos autosomomis (A). Bridžesas dar 1922 m. išaiškino, kad

drozofilos lytį lemia ne tik X chromosomų lyginis-nelyginis skaičius, bet ir X **chromosomų bei autosomų balansas** (santykis).

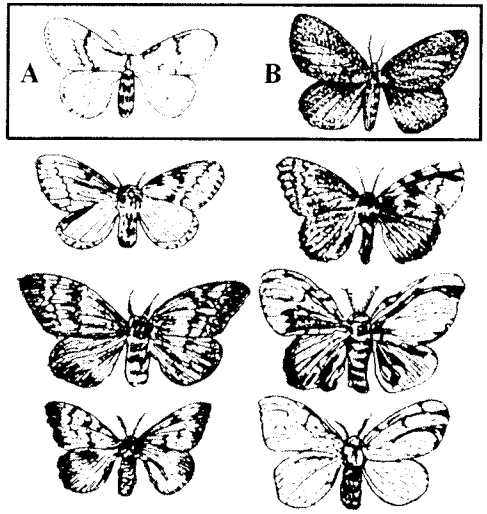
Bridžesas aptiko triploidines (3X + 3A) drozofilų pateles. Kai kurios iš jų buvo vaisingos. Jas sukryžminus su diploidiniais patinėliais (XY + 2A), gauti palikuonys įvairiu X chromosomų ir autosomų santykiu. Kolekciją papildė ir įvairios aneuploidinės linijos su skirtingu X ir Y chromosomų skaičiumi. Santykiai ir rezultatai buvo tokie:

santykis **X : A = 1,0**	– normalios patelės
santykis **X : 2A = 0,5**	– normalūs patinėliai,
santykis **3X : 2A = 1,5**	– hipermorfinės
4X : 3A = 1,3	patelės (sterilios)
santykis **3X : 4A = 0,75**	– interseksai
2X : 3A = 0,67	
santykis **X : 3A = 0,33**	– hipermorfiniai patinėliai

Tarp jų atsiradę **interseksai** (lot. *inter* – tarp + *sexus* – lytis), (santykis ~0,7 – **tarp 1,0 ir 0,5**) **yra tarpiniai tarp patelių ir patinėlių.** Juose, kitaip negu ginandromorfuose, nėra skirtingos lyties sektorių, o yra pakitęs bendras viso organizmo lytinis išsivystymas. Atskirų individų interseksualumas pasireiškia įvairiai (5.13 pav.).

Galima padaryti išvadą, kad vabzdžių Y chromosoma yra bereikšmė, tik kaip priedas chromosomų porai sudaryti. Drozofilos patinėlis su viena X chromosoma ir be Y chromosomos yra sterilus, tačiau XXY – ne tik tipiškos, bet ir vaisingos patelės. Taigi drozofilos ir daugelio vabzdžių lytį lemia ne pavieniai genai, o X chromosomų balansas.

Kaip drozofila skaičiuoja, kada lyginis ar nelyginis X chromosomų skaičius? Nieko mistiško. Tik aptikta nauja, kitaip valdomų genų



5.13 pav. **Drugio *Lymantria dispar* interseksai:**
viršuje rėmelyje: *A* – normali patelė; *B* – normalus patinėlis; kiti – interseksai

grupė. Tai **genai numeratoriai**. Daugelio šių genų mutacijos sukelia bendrą (vyriškąjį ir moteriškąjį) arba tik vyriškąjį ar moteriškąjį sterilumą. Taip šie genai aptinkami ir tiriami.

Tarp šių genų aptiktas toks, kurį galima pavadinti **pagrindiniu** – ***Sxl*** (angl. *sex lethal*), kuris valdo ne tik somatinę lyties diferenciaciją, bet ir X chromosomos dozės kompensaciją. Drozofilos X chromosomos dozės kompensacija irgi pasireiškia kitaip negu žinduolių. Baro kūnelis nesusidaro (žr. p. 193). Paprasčiausiai patinėlio X chromosomoje esantys genai veikia dvigubai aktyviau, negu tie patys genai patelės X chromosomoje.

Vieni drozofilos lyties valdymo genai yra X chromosomoje, ir jie yra **numeratoriai,** kiti genai yra autosomose. Jie yra silpni numeratorių valdymo genai ir vadinami **denominatoriais.** Genų numeratorių veiklą valdo X chromosomų skaičius.

Žmogaus, žinduolių lyties valdymas. Formaliai lytį lemia lytinės chromosomos, net labai panašiai į drozofilos lytį:

- moteriškoji lytis – XX
- vyriškoji lytis – XY

Tačiau ištyrus **lytinių chromosomų aneuploidus**, kurių pakitęs X arba Y chromosomų skaičius, paaiškėjo, kad

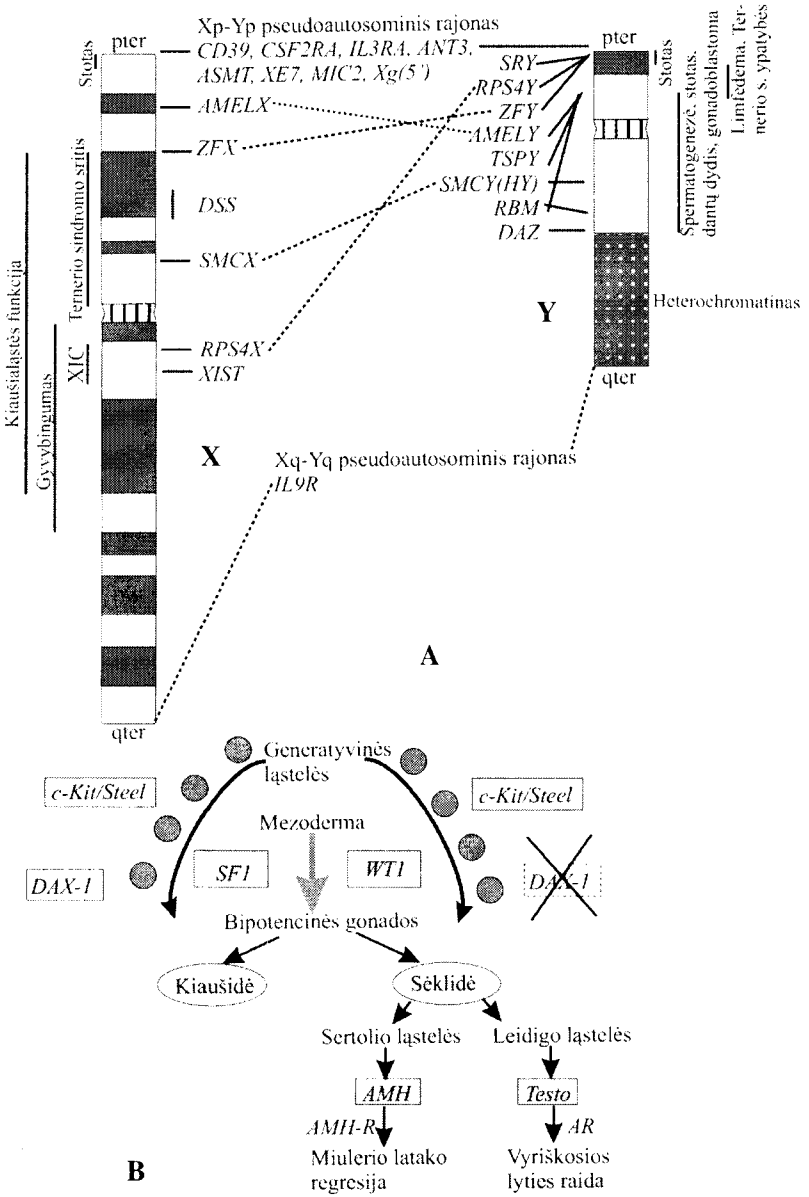
nors žmogaus lytį lemia chromosomų balansas, **ypatingai svarbi Y chromosoma**:
X (Ternerio liga), XXX, XXXX – mot.,
XYY, XXY (Klainfelterio liga), XXXY, XXXXY – vyr.

Vadinasi, asmuo su keturiomis X chromosomomis, bet su viena Y chromosoma vis tiek yra vyriškosios lyties. Daugelis šių aneuploidijos sukeltų ligų nagrinėjamos atskirai (žr. p. 425).

Tačiau žinduoliams, žuvims būdinga ir **antrinė lyties determinacija, kurią valdo lytiniai hormonai** (žr. toliau). Žmogaus ryškus ir svarbus yra 3-iasis valdymo kanalas, t. y. **aukštosios nervinės veiklos/psichologinis valdymo būdas.**

Y chromosomoje esantys genai. Y chromosomoje yra nedaug genų, bet jie lemia svarbias organizmo savybes – morfogenezę, gyvybingumą, ūgį (stotą) ir pagal paveldėjimo pobūdį jie yra dviejų tipų:

- **pseudoautosominiai genai yra abiejose lytinėse chromosomose – X ir Y.** Trumpajame Y chromosomos petyje yra apie 2560 kb ilgio pseudoautosominis regionas. Jam homologinis rajonas yra X chromosomos trumpojo peties gale (Xp22.3). Šiais segmentais ir sąveikauja X ir Y chromosomos mejozėje kaip viena homologinių chromosomų pora. Regione tarp X ir Y chromosomų vyksta ir krosingoveris. Pseudoautosominiame regione yra gana daug genų (5.14 pav., *A*), tarp jų tokių, kurie veikia ūgį. Štai kodėl vyrai aukštesni, o įvairių tipų heteroploidai su Y chromosoma yra ištįsę (žr. p. 426). Nors pseudoautosominiai genai yra abiejose (X ir Y) chromosomose, jų paveldėjimas susijęs su lytimi (žr. p. 577). Šiame regione bent penkiose vietose yra CpG salelės. Jos gali lemti netolygų krosingoverį. Palyginti neseniai aptiktas dar vienas pseudoautosominis rajonas ilgojo peties (q) gale (apie 400 kb);
- **tik Y chromosomoje esantys genai,** kuriuos paveldi tik vyriškosios lyties palikuoniai; jų lemiami požymiai vadinami **holandriniais** (žr. p. 578). X chromosomoje šiems genams homologų nėra. Y chromosomoje yra ir genas SMCY, kuris koduoja **H-Y antigeną**, lemiantį vyro ir moters audinių nesuderinamumą.



5.14 pav. **Žmogaus X ir Y chromosomų palyginimas (A) ir lyties raidos valdymas (B):**

Pseudoautosominiai genai (~2,6Mb): *CSF2RA* ir *IL3RA* – citokino receptoriaus α subvienetų, *ANT3* – adenino nukleotido translokazės, *CD39, MIC2* – limfocitų antigenų, *ASMT* – acetilserotoninmetiltransferazės, *XE7* – branduolio baltymo (funkcija nežinoma), *Xg* – eritrocitų antigenų, *IL9R* – kito citokino receptoriaus nutolęs genas

Y specifiniai genai: *SRY* – sėklides lemiantis, *ZFY* – „cinko pirštelių" baltymo, *RPS4Y* – ribosomų baltymo, *AMELY* – amelogenino (dantų emalio), *SMCY(H-Y)* – Y valdomo audinių nesuderinamumo, *TSPY, RBM, DAZ* – spermatogenezės

X chromosomos genai: *AMELX, ZFX, SMCX, RPS4X* – genai, homologiški Y chromosomos genams (paryškinti genai, veiklūs Baro kūnelyje), *XIST* – X chromosomos inaktyvinimo (Baro kūnelio), *DSS* – nuo dozės priklausomos SR

Gonadų raidos valdymo genai: *c-Kit, slf (steel)* – generatyvinių ląstelių migracijos: *c-Kit* – Kit transmembraninio receptoriaus, *slf* – steel veiksnių (transmembraninių baltymų), *SF1* – branduolio receptoriaus, *WT1* – transkripcijos veiksnio, *DAX1* – branduolio receptoriaus, *SRY, SOX9* – HMG tipo transkripcijos veiksnių, *AMH* – TGF-β šeimos baltymo, *AMHR* – transmembraninio receptoriaus, *Testo* – testosteronų (grupė), *AR* – transkripcijos veiksnio.

Paaiškinimai 5.14 pav. tekste remiantis A. R. Zinn, 1998; C. A. Quigley, 1998.

Molekulinės genetikos metodais palyginus nukleotidų sekas X ir Y chromosomose, aptikta dar viena grupė genų, kurie, nors ir nepriklauso pseudoautosominiams rajonams, yra homologiniai (5.14 pav., *A*, jie pavaizduoti punktyrinėmis linijomis). Dar viena šių genų ypatybė: jie neaktyvinami Baro kūnelių virstančioje X chromosomoje. Y chromosomoje yra daug konstitutyviojo heterochromatino, bet dėl jo genetinio aktyvumo iki šiol tebėra daug neaiškumų. Be to, Y chromosomoje daug paprastųjų kartotinių (TCTG, TATA, GATA) sekų. Jos sudaro **mikrosatelitus**.

Lyties reversija. Senokai buvo žinoma, kad Y chromosomoje yra neturintis homologo X chromosomoje *TDF* (angl. *testes determining factor*) lokusas. Šiuo metu šis genas vadinamas ***SRY*** (*sex reversal (gene) on Y*). Jo atradimas – ištisa istorija ir yra susijęs su viena neįprasta lyties anomalija, kai **kariotipas XX, o fenotipas – vyriškas. Tai – lyties reversija.** Nuo jos ir *SRY* geno pavadinimas. Paaiškėjo, kad lyties reversija, kuri sutrumpintai žymima SR, atsiranda todėl, kad iš Y chromosomos į X chromosomą perkeliamas (translokuojamas) būtent tas Y chromosomos segmentas, kuris lemia vyriškąją lytį.

Vėliau dirbtinai genų inžinerijos metodais *SRY* lokusas perkeltas iš pelių Y chromosomos į X chromosomą ir įsitikinta, kad dėl to transgeninės pelės yra vyriškosios lyties, be jokių kitų fenotipo sutrikimų.

SRY geno translokacija į X chromosomą nulemta ***SRY*** geno vietos Y chromosomoje. Šis lokusas yra arti telomeros, šalia pseudoautosominio regiono, ir krosingoveris gali „užgriebti" ir perkelti SRY geną į X chromosomą.

Pelės genome šis genas veikia trumpai – tik tarp 10,5–12,5 vaisiaus vystymosi dienų. Per šį trumpą laiką susiformuoja vyriškoji lytis.

SRY – dar ne viskas. Šiuo metu Y chromosomoje žinomi **7 lokusai**, kurie svarbūs spermatogenezei. Trys iš jų įdomūs tuo, kad turi ilgas išaugas į šonus (panašiai kaip chromosomų – „lempų šepečių"), bet šių išaugų paskirtis dar kol kas neaiški. Be to, X chromosomoje aptikti lokusai, kurių mutacijos irgi gali lemti lyties reversiją.

Pastaruoju metu ypač domimasi dar vienu genu, kuris yra ilgajame Y chromosomos petyje. Tai genas *DAZ* (arba *AZF*). Šio geno mutacijos sukelia **azoospermiją** – visišką spermos nebuvimą sėklos skystyje.

Vėl genų balansas: XX ir XY lyties reversijos. Autosominiai lyties genai. Aptikta ne tik XX lyties reversija, kai kariotipas moteriškas, o vystosi vyriškoji lytis, bet ir XY lyties reversija. Kariotipas **XY**, o vystosi **moteriškoji lytis**. Ją sukelia kelių genų mutacijos:

- gali būti slopinama *SRY* geno veikla dėl taškinių mutacijų arba delecijų,
- dėl duplikacijų X chromosomoje, esančių *DSS* (angl. *dosage – sensitive sex reversal*) lokusų (*DAX1*) duplikacijų,
- ir netgi genų, esančių autosomose (*SOX9*, *WT1*).

Įdomiausia tai, kad autosominis *SOX9* genas net 60% yra homologinis *SRY* genui ir koduoja HMG tipo transkripcijos veiksnį, kaip ir *SRY* genas. *WT1* irgi koduoja transkripcijos veiksnį. Jo mutacijos gali sukelti Wilmso vėžį.

Vadinasi, kaip ir drozofilos, žmogaus lytį lemia ne tik lytinėse chromosomose, bet ir autosomose esantys genai – **visų šių genų balansas.**

Žinduolių gonadų raida (5.14 pav., *B*). Generatyvinio kelio ląstelės migruoja į vietą, kur vystysis gonados. Šį reiškinį valdo autosominiai genai *slf* (*Steel*, 12q22) ir *c-Kit* (4q12). Abu genai koduoja tran-

smembraninius baltymus, vadinasi, priimančius signalus iš šalies. Tad lyties raidos genų kaskadoje yra ir aukštesnio rango genai, kurie valdo *slf* ir *c-Kit* genų veiklą.

Manoma, kad pirmasis genas, kuris lemia **bipotencinių** (nediferencijuotų pagal lytį) gonadų raidą, yra autosominis – *SF1*(*Ftz*-F, 19q33). Jis lemia branduolyje veikiantį receptorių ir valdo kitus vėliau veikiančius genus *AMH*, *WT1*, *DAX1* ir galbūt net *SRY*.

Įdomu, kad *SF1* yra homologiškas drozofilos segmentacijos raidos genui *fushi tarazu*. Tad dar kartą galima įsitikinti drozofilos tyrimų svarba žmogaus genetikai.

Toliau bipotencinės gonados diferencijuojasi į **vyriškąsias** (sėklides) ir **moteriškąsias** (kiaušides) **gonadas**. Štai nuo šio momento raidai „diriguoja" *DAX1*, *SRY* ir kiti X ir Y chromosomoje esantys genai. Kai *DAX1* slopina *SRY* geną, bipotencinės gonados vystosi į kiaušides. Neslopinamas *SRY* genas lemia sėklides (*testis*).

Tačiau vėl neapsieinama be autosominių genų *AMH*(19p13.2–13.3), *WT1*(11p13), *SOX9*(17q24–25), didelės grupės genų, kurie lemia lytinių hormonų sintezę ir metabolizmą. Antai dėl citochromų P-450 11, 17, 21 šeimas lemiančių genų mutacijų pasireiškia vyriškasis arba moteriškasis pseudohermafroditizmas.

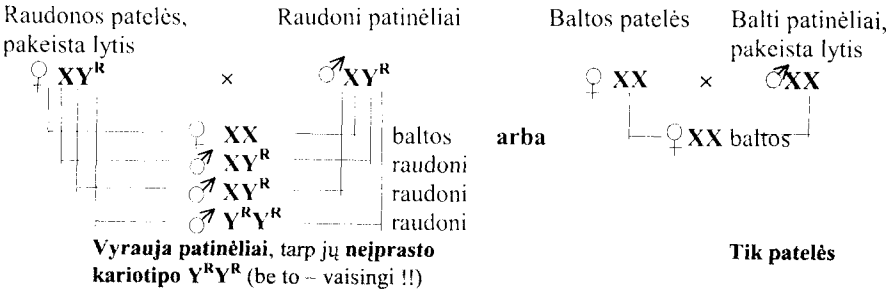
Lyties raida pereina į naują fazę, kurioje itin svarbūs lytiniai hormonai ir jų receptoriai.

Hormoninė lyties determinacija. Vaisiaus sėklidės gamina vyriškąjį lytinį hormoną testosteroną, o šis ir jo deriniai toliau valdo diferenciaciją į vyriškąją lytį. Maždaug XX a. ketvirtajame dešimtmetyje prancūzų embriologas Jostas (A. Jost) atliko tokį bandymą: prieš prasidedant vyriškosios lyties diferenciacijai, triušio vaisiui pašalino gonadas. Ir tada jis vystėsi kaip moteriškosios lyties individas.

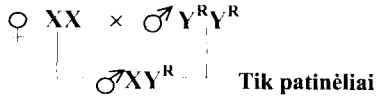
Įdomius bandymus atliko japonų mokslininkai su akvariumine žuvele *Oryzias latipes*. Šiai žuvelei būdingas ryškus lytinis dimorfizmas: patinėliai spalvingi, išilgai viso kūno eina raudona juosta, o patelės baltos (be pigmento). Spalvos skirtumai priklauso nuo **geno Y^R,** kuris yra Y chromosomoje. Patinėliai turi šį geną, todėl tokie spalvingi, o patelės jo neturi, todėl pigmentas nesusidaro. Tipiškas holandrinio požymio paveldėjimas.

Žuvų mailius ištisus 8 mėnesius gavo moteriškųjų lytinių hormonų, – tada išaugo spalvotų patelių, arba visą šį laikotarpį – vyriškųjų

hormonų, ir buvo aptikta baltų patinėlių. Abiejų grupių žuvelių pakeista lytis. Jos buvo vaisingos, todėl buvo poruojamos su normaliomis priešingos lyties žuvelėmis, ir palikuonys buvo tik patelės:



Poruojant neįprastus Y^RY^R patinėlius su normalaus kariotipo patelėmis, palikuonys buvo tik patinėliai:



Vadinasi, hormonais galima valdyti lytį, bet **lyties pakeitimas nekeičia paveldėjimo pobūdžio.** Paveldima taip, kaip lemia ne fenotipas, o genotipas, šiuo atveju lytinių chromosomų kariotipas.

Bandymai pakeisti hormonais žinduolių lytį buvo nesėkmingi. Matyt, „įsikiša" motinos organizmas, bet dėl hormonų sintezės arba veiklos sutrikimų natūraliai pakitusios lyties asmenų yra žinoma, šis reiškinys nagrinėtas. Prisiminkime **testikulinę feminizaciją:** kariotipas XY, o fenotipas moteriškas, tiksliau, pasireiškia įvairaus laipsnio vyriškasis pseudohermafroditizmas, atsiradęs dėl hormono receptorių mutacijų.

Sutrikęs lytinių hormonų balansas gali sutrikdyti lytį ir vėlesniais raidos etapais.

B. MUTACINIS KINTAMUMAS

Kintamumas – bendra visų organizmų savybė, viena iš centrinių genetikos problemų. Jis sukuria organizmų įvairovę.

Organizmų įvairovė – tai, kas pirmiausia krinta į akis. Pirmieji kintamumo tyrėjai buvo visa žmonija, auginanti augalus ir naminius gyvūnus ir atliekanti jų **atranką**.

Kintamumo mokslinio tyrimo pradininku laikomas Lamarkas, taip pat Darvinas. Abu evoliucijos mokslo kūrėjai. **Evoliucija be kintamumo neįmanoma**.

Visi organizmų pokyčiai skirstomi į **paveldimus** ir **nepaveldimus**. Nepaveldimi pokyčiai yra **modifikacijos**, kurios atsiranda dėl įvairių aplinkos poveikių. Paveldimi pokyčiai sudaro dvi stambias grupes: **rekombinacijas** ir **mutacijas**. Rekombinacijos visuomet pasireiškia vienaip ar kitaip derinantis dviejų organizmų genetinei medžiagai. Mutacijų ir rekombinacijų atsiradimas dažniausiai vienas su kitu susiję.

Lamarkui tektų garbė būti pirmuoju nepaveldimo kintamumo tyrėju. Į mutacijų ir rekombinacijų pirmuosius tyrėjus pretendentų daug, bet mokslas apie rekombinacijas ėmė žengti į priekį, kai de Fryzas, Korensas ir Čermakas 1900 m. „atrado" Mendelį (G. Mendel), o apie mutacijas, kai de Fryzas, 1902–1903 m. paskelbė „Mutacijų teoriją".

VI. MUTACIJOS

Nuo seno pastebėta, kad retkarčiais tarp augalų ir gyvūnų netikėtai atsiranda individų, kurie vienokiu ar kitokiu požymiu ryškiai skiriasi nuo kitų tos rūšies individų. Ne visuomet tokie pokyčiai yra **mutacijos** (lot. *mutatio* – pasikeitimas, permaina).

1590 m. vienas vokiečių vaistininkas aptiko ugniažolės augalą giliai suskaidytais lapais. Ši įdomi ugniažolės forma ir dabar auginama botanikos soduose. 1791 m. vienoje Naujosios Anglijos (JAV) fermoje avis atsivedė ėriuką ilgu liemeniu ir trumpomis kreivomis kojomis. Taip prasidėjo Ankono avių veislė.

6.1. Bendras mutacijų apibūdinimas

De Fryzo mutacinė teorija. De Fryzas ilgus metus tyrinėjo įvairius paveldimus nakvišų (*Oenothera*) pokyčius. Tyrimų duomenis apibendrino dviejų tomų knygoje „Mutacijų teorija“. Jis išaiškino pagrindines mutacijų savybes. Čia de Fryzo nuostatos pateikiamos su komentarais.

1. Tokie pokyčiai paprastai atsiranda **staiga, šuoliškai**. Tėvų genotipas tokių pokyčių neturėjo arba to paties individo dalis kūno ląstelių yra naujai pakitusios.

2. Mutacijos yra **griežtai apriboti pokyčiai**. Nesusidaro nepertraukiamų kintamumo eilių, kurios būdingos variaciniam kintamumui (modifikacijoms). Tai istorinė nuostata. Ji buvo itin aktuali XX a. pradžioje, kai klestėjo lamarkizmas, o geriausiai ištirtas kintamumo tipas buvo **variacijos** (modifikacijų pasireiškimo forma). Šią nuostatą verta žinoti ir dabar.

3. Mutacijų **kryptis įvairi**. Pavyzdžiui, de Fryzas aptiko nakvišos augalus gigantus (6.1 pav.) ir mažaūgius tamsiai žaliais ir šviesiai žaliais lapais ir kt. Ypač daug ginčų kilo dėl žalingų ir naudingų mutacijų santykio. Vieni genetikai (tarp jų ir šios knygos autorius) mano, kad dauguma mutacijų yra žalingos ir tik maža jų dalis (augalų gal viena iš 1000, o gyvūnų – dar rečiau) yra naudingos. Kiti, ypač tie, kurie siūlė mutacijas kaip metodą naujoms veislėms sukurti, – kad naudingų mutacijų yra daug.

6.1 pav. **Nakvišos (*Oenothera lamarckiana*) normalus augalas (kairėje) ir de Fryzo aptikti mutantai *nannela* ir *gigas***

Kodėl dauguma naujų mutacijų yra žalingos? Kiekvieną taksoną galima laikyti ilgalaikės kūrybos (atrankos) kūriniu. Nors jis nėra visiškai tobulas, bet yra optimalus variantas užimamai ekologinei nišai. Labai maža tikimybė, kad naujai atsiradęs pokytis būtų geresnis už optimalų variantą.

Tai galima palyginti su žmogaus veikla kuriant įrankius. Ar lengva patobulinti plaktuką? Mačiusieji (kad ir TV ar kine) automobilių paradus, galėjo įsitikinti, kokiu tempu jie tobulėjo XX a. pradžioje. O dabar vis sunkiau patobulinti automobilį.

4. Naujos formos yra **konstantinės**. Tai santykinė nuostata. Diploidinių eukariotų genome mutacija paprastai įvyksta vienoje iš chromosomų. Antroje chromosomoje genas lieka normalus (išskyrus vadinamąsias **visiškas** mutacijas, kai mutacija vienu metu atsiranda abiejuose aleliniuose homologinių chromosomų lokusuose). Susikuria heterozigotiškumas, dėl jo palikuonys gali būti įvairūs.

Kitas reiškinys – naujai atsiradusios mutacijos gali būti **genetiškai nestabilios**. Tai labai priklauso nuo mutacijos atsiradimo būdo. Paradoksalu, bet ir nakvišos rūšiai (*Oenothera lamarciana*), tarp kurios augalų de Fryzas aptiko mutacijų, būdingas genetinis nestabilumas dėl to, kad ši rūšis yra hibridinė. Tačiau daug nakvišos formų, kurias aptiko de Fryzas, buvo tikros genų mutacijos. Kita dalis – aneuploidai (žr. toliau), atsiradę dėl nedėsningo chromosomų pasiskirstymo tolimuosiuose hibriduose, t. y. dėl jų genetinio nestabilumo.

5. **Mutacijos gali vykti pakartotinai** ir vėlgi įvairiomis kryptimis, tarp jų gali būti ir grįžtamųjų mutacijų (žr. toliau).

6. **Galimybė aptikti mutaciją priklauso nuo ištirtų individų skaičiaus**.

7. **Organizmams būdingi mutaciniai periodai**. Ilgą laiką šis teiginys buvo atmetamas. Tačiau R. Berg ir M. Golubovskis, tirdami drozofilos mutacijų dažnį gamtinėse populiacijose įvairiais metais (ilgą laikotarpį), nustatė, kad mutacijų dažnis nepastovus. Būna laikas, kai mutacijos labai dažnos. Taigi mutaciniai periodai yra realus reiškinys.

De Fryzas neteisingai manė, kad mutacijos yra tik stambūs pokyčiai, ir rūšys atsiranda iš karto, šuoliškai. Tai visapusiškai neteisingas teiginys. Pirma, rūšis yra sistema, visuma organizmų, kurie tam tikru būdu santykiauja su kitais organizmais ir aplinka, užima tam tikrą nišą bendroje ekologinėje sistemoje. Tokių santykių tik dėl vienos mutacijos atsirasti negali. Antra, dažnesnės yra smulkios mutacijos.

Mutacijų klasifikacija sudėtinga ir įvairiais aspektais:

- pagal tai, **kuriose ląstelėse jos įvyko** ir kaip paveldimos, – generatyvinės ir somatinės;
- pagal **kryptį** – tiesioginės ir grįžtamosios;
- pagal **atsiradimo būdą** – gamtinės ir indukuotos;
- pagal **genotipo pokyčius** – itin sudėtingas skirstymas į grupes: 1 – **nebranduolines**; 2 – **branduolines**:
  - **genomo** (chromosomų skaičiaus),
  - **chromosomų** (sandaros),
  - **genų**.

Kiekviena grupė skirstoma smulkiau:

- pagal **fenotipo pokyčius:** morfologinės, fiziologinės, biocheminės;
- pagal **požymio pokyčio kryptį** – hipermorfinės, hipomorfinės, amorfinės, antimorfinės, neomorfinės;
- pagal **vaisingumą** – vaisingos, pusiau sterilios, sterilios;
- pagal **gyvybingumą** – gyvybingos, pusiau letalios, letalios (mirtinos).

Dėl mutacijos pakitęs organizmas vadinamas **mutantu,** o mutaciją sukėlęs veiksnys – **mutagenu.**

6.2. Generatyvinės ir somatinės, tiesioginės ir grįžtamosios mutacijos

Generatyvinės ir somatinės mutacijos. Mutacijos atsiranda bet kurioje organizmo ląstelėje bet kuriuo individualios raidos momentu. Tai būdinga visų tipų mutacijoms. Tačiau priklausomai nuo to, kokiose ląstelėse (generatyvinėse ar somatinėse) atsiranda, jos skirtingai pasireiškia fenotipe. Skiriasi ir jų paveldėjimas.

Generatyvinėse ląstelėse (ne tik lytinėse, bet ir tose ląstelėse, iš kurių vystosi lytinės ląstelės) vykstančios mutacijos vadinamos **generatyvinėmis**. Jos gali būti paveldimos palikuonių (lytinėse) kartose.

Tolesnis generatyvinės mutacijos likimas priklausys nuo to:

- ar pakitusios generatyvinės ląstelės dalyvaus **apsivaisinime**;
- kokio pobūdžio yra mutacija – **dominuojančioji** ar **recesyvioji**;
- kaip mutantines ląsteles veikia **atranka**.

Recesyviosios mutacijos gali būti paveldimos ilgą laiką daugelyje kartų nepasireikšdamos, o dėl genų dreifo recesyvusis genas gali labai paplisti populiacijoje. Tokios padėties pavyzdžiu dažnai nurodoma Anglijos karalienė Viktorija, kuri per savo dukras išplatino recesyvųjį mutantinį hemofilijos geną. Pavyzdžių yra labai daug.

Kitaip paveldimos ir pasireiškia somatinės mutacijos.

Kadangi iš somatinių ląstelių nesivysto lytinės ląstelės, mutacija kitoms kartoms nepersiduoda. Organizmai, kuriuose įvykusios somatinės mutacijos, genotipiškai ir dažnai fenotipiškai yra mozaikos.

Pavyzdžiui, ant obels vaisiaus gali būti kitokios spalvos ruožas. Ir drozofila, kurios pusė kūno vyriškos lyties, o kita pusė moteriškos, yra somatinė mutacija (žr. 5.8 pav.).

Ne kiekviena mozaika yra somatinė mutacija. Kaip minėta, mozaikos gali atsirasti ir dėl somatinio krosingoverio, genų veiklos pokyčių somatinėse ląstelėse. Kartais mozaika susidaro dėl generatyvinės mutacijos. Antai baltas, visiškai be pigmento plaukų kuokštas dažniausiai yra somatinė mutacija. Vienoje šeimoje šis pokytis buvo net keliose kartose, be to, maždaug toje pačioje vietoje.

Somatinių ląstelių genomo pertvarką galima vertinti kaip somatines mutacijas. Kai kurie genetikai šiuos somatinių ląstelių pokyčius net siūlo vadinti **biologinėmis mutacijomis**. Dirbtinai galima somatinę mutaciją paversti generatyvine, regeneruojant visą organizmą iš vienos somatinės ląstelės. Šis būdas dabar plačiai taikomas, kai norima gauti augalų mutantus su įvairiomis žmogui naudingomis savybėmis (pvz., atsparius ligoms, įvairių medžiagų producentus ir kt.).

Tiesioginės ir grįžtamosios mutacijos. Mutacijos iš pradinio tipo į mutantą vadinamos tiesioginėmis – priešingai grįžtamosiomis mutacijomis.

Grįžtamosios mutacijos, arba **reversijos** (lot. *reversio* – grįžimas) yra būdingos mutantams, t. y. jau kartą dėl mutacijos pakitusiems organizmams.

Grįžtamosios mutacijos paprastai yra gerokai retesnės negu to paties geno tiesioginės mutacijos. Mat vieno geno, ar jis būtų normalus, ar mutantinis, mutavimo dažnis yra toks pats (gamtinėmis sąlygomis apie 10^{-5}–10^{-6}), tačiau tikimybė mutantui pakisti taip, kad grįžtų į pradinį fenotipą, turi būti mažesnė negu nurodytas dydis.

Dalis mutanto pakartotinių mutacijų vyksta kitomis kryptimis, ne į pradinį tipą.

Grįžtamųjų mutacijų dažnį lemia genomo pokyčio pobūdis. Dažniausiai taip pakinta genai (genų mutacijos). Pakitus chromosomų skaičiui ir sandarai, grįžtamosios mutacijos retos. Organizmas, kuris išsivystė po grįžtamosios mutacijos, vadinamas **revertantu**.

Grįžtamųjų mutacijų įvairovė. Įvairūs grįžtamųjų mutacijų tipai minėti nagrinėjant genetinį kodą (žr. p. 60). Tokios mutacijos buvo panaudotos genetiniam kodui patikrinti.

Tiksliai į tokią pačią padėtį mutacija grįžta labai retai. Kur kas dažnesnės grįžtamosios mutacijos, kai vietoj beprasmio kodono susidaro koks nors kitas kodonas, koduojantis aminorūgštį arba neveikliame rėmelio poslinkio mutante įvykus Kriko reversijai (priešingo ženklo pokyčiui netoli pirmojo pokyčio), t. y. įsiterpus nukleotidų porai, jeigu anksčiau buvo nukleotidų pora iškritusi, arba iškritus nukleotidų porai, jeigu anksčiau mutante buvo įsiterpusi nukleotidų pora. Nors po Kriko reversijos baltymas vėl sintetinamas, bet jis yra mutantinis, nes genetinis kodas nuo vienos pažaidos iki kitos, revertuojančios pirmąją pažaidą, būna pakitęs.

Reversijos gali atsirasti ir dėl nealelinių genų supresorių. Prisiminkime, kad yra supresorių, kurie revertuoja *nonsens* mutacijas. Tai tRNR genų mutacijos, kurios vyksta antikodone. Jo nukleotidų seka tampa komplementari beprasmiam kodonui. Revertanto baltymo sintezė vėl atsistato, bet baltymas būna mutantinis, nes viena iš aminorūgščių, esančių normaliame baltyme, pakeista kuria nors kita priklausomai nuo to, kurios tRNR antikodone buvo tokia mutacija.

Pagaliau reversijos gali atsirasti dėl netolygaus krosingoverio arba IS, Tn pakeitus vietą.

6.3. Mutacijų grupės pagal genotipo pokyčius (bendra apžvalga)

Pagal branduolinį ir nebranduolinį paveldimumą išskiriami ir du pagrindiniai mutacijų tipai: 1) branduolinės mutacijos, 2) nebranduolinės mutacijos.

Branduolinės mutacijos. Su branduoliu susiję 3 pagrindiniai mutacijų tipai.

1. **Genomo mutacijos** – pakitęs chromosomų skaičius. Jos skirstomos taip:

- **poliploidija** (**eupoliploidija**, gr. *eu* – gerai), kai chromosomų skaičius kinta ištisais kartotiniais chromosomų rinkiniais. Poliploidija priklausomai nuo to, kaip ji atsiranda, skirstoma taip: **autopoliploidija** (gr. *autos* – pats), kai įvyksta endomitozė – padvigubėjusios chromosomos, bet nesusidaro dukteriniai branduoliai, neišsiskiria, arba susilieja dvi tokių pačių genomų somatinės ląstelės; **alopoliploidija** (gr. *allos* – kitas), kai skirtingų rūšių genomai susilieja įvairiais tolimosios hibridizacijos, tarp jų ir tolimųjų taksonų somatinių ląstelių hibridizacijos, būdais.
- **aneuploidija** (heteroploidija), kai pakinta (sumažėja – hipoploidija arba padidėja – hiperploidija) pavienių chromosomų skaičius.

Organizmai, kurių ląstelėse pakinta chromosomų rinkinių skaičius, yra **poliploidai**, o kai pakitęs pavienių chromosomų skaičius, – **aneuploidai** (heteroploidai). Poliploidai ir aneuploidai dar skirstomi pagal tai, keli yra chromosomų rinkiniai arba kelios homologinės chromosomos. Šis skirstymas nagrinėjamas atitinkamuose poskyriuose.

2. **Chromosomų mutacijos**, kai pakitusi chromosomos sandara:

- **delecijos**, kai iškrinta segmentas iš chromosomos vidurio arba iš kurio nors chromosomos galo;
- **duplikacijos**, kai tas pats chromosomos segmentas kartojasi du kartus;
- **inversijos**, kai chromosomos segmentas pasisuka 180°;
- **insercijos**, kai į chromosomą įsiterpia segmentas;
- **translokacijos**, kai chromosomos segmentas perkeliamas į kitą vietą toje pačioje chromosomoje – **viduchromosominės translokacijos**, arba iš vienos chromosomos perkeliamas į nehomologinę chromosomą – **tarpchromosominės translokacijos.**

Kai kurie chromosomų mutacijų ir genetinės rekombinacijos tipai yra labai susiję, pavyzdžiui, krosingoveris. Tai abipusis segmentų keitimasis tarp homologinių chromosomų. Dėl netolygaus krosingoverio vienoje iš homologinių chromosomų susidaro duplikacija, o kitoje – delecija.

Chromosomų mutacijas patogiausia tirti politeninėse chromosomose dėl dviejų priežasčių:

- **galima įžiūrėti ir labai nedidelius chromosomų sandaros pokyčius** (pvz., disko padėties pokyčio, žr. toliau, 6.20 pav.),
- **homologinės chromosomos matomos konjugavusios ir mitozėje**. Mat lengviausia chromosomų mutacijas aptikti, kai vienoje iš homologinių chromosomų yra mutacija, o antra homologinė chromosoma nepakitusi.

Chromosomų mutacijas mitozėje galima pastebėti ir dažant chromosomas diferenciniu būdu, ypač chromosomas spalvinant įvairiomis spalvomis (žr. 1.12 pav.). Chromosomų mutacijos nustatomos ir genetiniais metodais.

3. **Genų**, arba **taškinės, mutacijos**. Tai pavienių genų pokyčiai. Šios mutacijos pro mikroskopą nepastebimos, todėl tiriamos tik genetiniais metodais.

Nebranduolinės mutacijos. Jos iš esmės atitinka branduolio genų mutacijas, nes kitokio pobūdžio nebranduolinių paveldimumo struktūrų pokyčiai kol kas nežinomi. Pakinta DNR segmentai (nebranduoliniai genai), koduojantys RNR arba baltymus, panašiai kaip branduolyje. Nebranduolinės mutacijos skirstomos taip:

- **plastidžių (chloroplastų) mutacijos**;
- **mitochondrijų mutacijos**;
- **plazmidžių mutacijos** (smulkiau skirstomos pagal tai, kuri plazmidė pakito);
- **kapa dalelių mutacijos** ir kt.

6.3.1. Genomo mutacijos

6.3.1.1. Autopoliploidija

Autopoliploidija – kartotinis to paties genomo chromosomų rinkinių pokytis. Rinkinių skaičius didesnis kaip du.

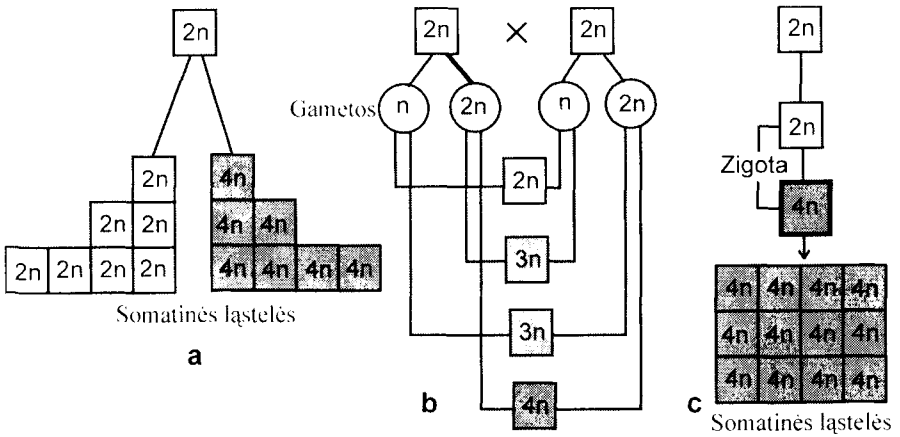
Autopoliploidų gavimas. Ir gamtiniai, ir dirbtiniai poliploidai dažniausiai atsiranda dėl endomitozės. Chromosomos padvigubėja, bet nesusidaro dukteriniai branduoliai.

Endomitozė dažniausiai vyksta todėl, kad nesusidaro achromatinė verpstė, kuri paskirsto padvigubėjusias chromosomas dukteriniams branduoliams. Yra daug veiksnių, stelbiančių baltymų tubulinų sintezę arba jų jungimąsi į mikrovamzdelius, pagaliau mikrovamzdelių jungimąsi į stambesnius jų agregatus – achromatinę verpstę.

Specifinis mutagenas, sukeliantis autopoliploidiją, yra **kolchicinas**. Jį pirmasis atrado 1936 m. Blekslis. Kolchicinas yra alkoloidas, išskiriamas iš augalo rudeninio vėlyvio (*Colchicum autumnale*). Jis stelbia tubulinų sintezę. Pats augalas šiai medžiagai yra atsparus. Nespecifiniai autopoliploidijos sukėlėjai (jie gausiai sukelia kitų tipų mutacijas) yra jonizuojantieji spinduliai. Poliploidai gali atsirasti dėl fiziologinių veiksnių, pvz., senstant. Kai kuriuose audiniuose (neuronuose, kepenų ląstelėse) poliploidija vyksta reguliariai ir susijusi su šių audinių funkcija. Kolchicinas sukelia poliploidiją tiek augalų, tiek gyvūnų (žmogaus) ląstelėse. Tačiau poliploidai – organizmai, kurių ląstelėse padidėjęs chromosomų rinkinių skaičius, dažniausiai yra augalai.

Gyvūnų gamtinių poliploidų pasitaiko rečiau, pvz., kai kurių silkių, karpių, tarakonų, tritono rūšių, tačiau jų poliploidų būna sutrikusi lyties raida. Dažniausiai išgyvena tik tos poliploidinės rūšys, kurios dauginasi partenogenezės būdu.

Mitozinė, mejozinė ir zigotinė autopoliploidija. Autopoliploidija, kaip ir kitų tipų mutacijos, gali vykti įvairiose ląstelėse bet kuriuo organizmo raidos momentu. Kai autopoliploidija pasireiškia **somatinėse ląstelėse** (6.2 pav., *a*), gaunama mozaika. Dalyje tokio organizmo ląstelių yra normalus diploidinis chromosomų skaičius, o kitoje dalyje poliploidinis (pvz., 4n). Poliploidinio sektoriaus dydis priklauso nuo to, kaip anksti ontogenezėje įvyko endomitozė, dėl kurios atsirado poliploidinės ląstelės.



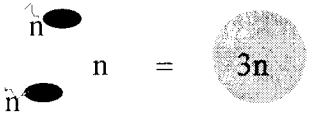
6.2 pav. **Mitozinės (*a*), mejozinės (*b*) ir zigotinės (*c*) autopoliploidijos pasekmės**

Po endomitozės, kuri įvyko generatyvinėse ląstelėse arba tose ląstelėse, iš kurių vystosi generatyvinės ląstelės, – yra **mejozinė poliploidija**. Po jos generatyvinėse ląstelėse yra ne haploidinis, o diploidinis chromosomų skaičius (6.2 pav., *b*). Tolesnis poliploidijos generatyvinėse ląstelėse likimas priklauso nuo to, kokios tėvo ir motinos lytinės ląstelės susilieja. Dauguma lytinių ląstelių turi nepakitusį, haploidinį chromosomų skaičių. Tad ir dauguma palikuonių yra normalūs diploidai. Kai susilieja lytinė ląstelė, kuri turi 2n, su normalia haploidine lytine ląstele 1n, zigota yra triploidinė – 3n.

Tikimybė labai menka, kad susilietų abi – tėvo ir motinos – lytinės ląstelės, kuriose įvyko gamtinė poliploidija: 2n + 2n = 4n – tetraploidas (6.2 pav., *b*).

Vis dėlto tarp žmogaus persileidimų pasitaiko ir tetraploidų (4n). Kur kas dažnesni (tris kartus) triploidai (3n). Apskritai žmogaus poliploidija sudaro apie 20% gemalų su chromosomų anomalijomis. Kartais gimsta žmogaus triploidai ar tetraploidai, bet jie trumpai gyvena. Įdomu, kad tetraploido fenotipo pokyčiai yra menkesni negu triploidų.

Kai chromosomų skaičius padvigubėja **zigotoje,** visos organizmo ląstelės yra poliploidinės (6.2 pav., *c*). Zigotinės poliploidijos priežastis papildo **apsivaisinimo anomalijos** – gali būti, kad vieną kiaušialąstę apvaisina du spermatazoidai:



Autopoliploidų grupės. Autopoliploidų biologines savybes daugiausia lemia lyginis (**ortoploidija**, gr. *orthos* – taisyklingas) arba nelyginis (**anortoploidija**) chromosomų rinkinių skaičius. Kai chromosomų rinkinių skaičius nelyginis, mejozė negali būti normali, ir **anortoploidai** (**3n, 5n, 7n** ir t. t.) būna sterilūs. Anortoploidija atsiranda susikryžminus dviem ortoploidams, kurie turi skirtingą chromosomų rinkinių skaičių, pavyzdžiui:

Tėvai	**2n** × **4n**	**4n** × **6n**
Gametos	**n** **2n**	**2n** **3n**
Palikuonys	**3n**	**5n**

6.3 pav. **Diploidiniai (kairėje) ir tetraploidiniai (dešinėje) grikiai**

Anortoploidija gali būti didelis kliuvinys kryžmadulkių augalų selekcijai. Naudojant ortoploidus selekcijoje, ypač kryžmadulkius augalus, susidarę anortoploidai paprastai yra nepageidautini. Pavyzdžiui, tetraploidiniams grikiams (6.3 pav.), kurių sėklos 2–3 kartus stambesnės už diploidų sėklas, susikryžminus su diploidais, hibridai yra triploidai ir sterilūs. To galima išvengti auginant tik tetraploidines veisles. Tai ne taip lengva.

Poliploidai vadinami pagal chromosomų rinkinių skaičių: 3n – triploidas, 4n – tetraploidas, 5n – pentaploidas, 6n – heksaploidas ir t. t.

Autopoliploidų mejozės ir chromosomų paskirstymo palikuonims ypatumai. Gamtoje egzistuojančių ortoploidų mejozė yra stabili ir reguliari: lytinėse ląstelėse chromosomų sumažėja per pusę, tolygiai pasiskirsto homologinės chromosomos:

Tėvai	**4n**	**6n**	ir t. t.
Gametos	**2n** **2n**	**3n** **3n**	

Todėl tetraploido lytinėse ląstelėse yra po dvi (kitų poliploidų – 6n, 8n, atitinkamai daugiau – 3, 4 ir t. t.) homologines chromosomas. Taigi poliploidų lytinės ląstelės gali būti **genetiškai negrynos:**

Tėvai	***AAAA***	***aaaa***	***AAaa***
Gametos	***AA***	***aa***	**1*AA* : 4*Aa* : 1*aa***

Vadinasi, kai tetraploidas yra heterozigotinis ***AAaa***, susidaro trijų tipų lytinės ląstelės ***AA, Aa, aa***, todėl, kryžminant tokius heterozigotinius tetraploidus tarpusavyje, homozigotiniai individai su recesyviuoju požymiu atsiranda tik santykiu 1:35:

	1AA	*4Aa*	*1aa*
1AA	*1AAAA*	*4AAAa*	*1AAaa*
4Aa	*4AAAa*	*16AAaa*	*4Aaaa*
1aa	*1AAaa*	*4Aaaa*	*1aaaa*

t.y. 1/36 ***AAAA*** : 8/36 ***AAAa*** : 18/36 ***AAaa*** : 8/36 ***Aaaa*** : 1/36 ***aaaa***

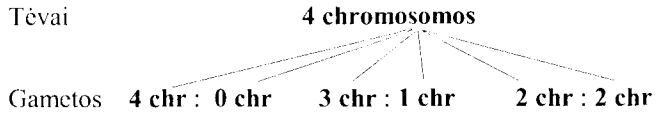
Heterozigotinių diploidų šis santykis būtų 1:3:

	A	*a*
A	*AA*	*Aa*
a	*Aa*	*aa*

t.y. 1/4 ***AA*** : 2/4 ***Aa*** : 1/4 ***aa***

Vadinasi, augalų poliploidai gali būti naudojami ilgalaikei heterozei gauti.

Naujai atsiradusių autopoliploidų mejozėje chromosomos dažniausiai **pasiskirsto labai netolygiai**. Pavyzdžiui, tetraploido lytinėse ląstelėse gali būti tokie kurios nors konkrečios homologinės chromosomos skaičiai:



Į vieną dukterinę ląstelę gali patekti visos keturios šios konkrečios homologinės chromosomos, o į antrą – nė vienos ir t. t. Šiuo reiškiniu naudojamasi augalų aneuploidams gauti.

Nesubalansuota mejozė yra antra kliūtis poliploidijai įdiegti selekcijoje. Neretai autopoliploidai intensyviau auga, bet lėtai vystosi. Tai trečia kliūtis panaudoti poliploidus selekcijoje.

Poliploidijos naudojimas selekcijoje. Nepaisant nurodytų kliūčių, poliploidai yra stambesni. Daugeliui augalų ši savybė svarbi ekonomiškai: stambesni žiedai, vaisiai, daugiau masės. Todėl poliploidija dažnai naudojama augalų selekcijoje. Genetikams tenka spręsti, kaip gauti stabilią konkrečių poliploidinių augalų mejozę, išvengti lėto poliploidų vystymosi ir kryžminimosi su diploidinėmis formomis. Pirmiausia ieškoma būdų, kaip organizmus dauginti vegetatyviškai. Taip dauginant išvengiama visų trijų kliūčių.

Dauguma žemės ūkio augalų yra poliploidai. Anksčiau žmogus atrinkdavo produktyvesnius augalus, netirdamas jų chromosomų, todėl gana dažnai tai būdavo poliploidai. Gamtiniai poliploidai yra kviečiai, avižos, bulvės, cukranendrės, bananai, žemės riešutai, žemuogės (braškės), serbentai, agrastai, slyvos, daug obelų veislių, kavamedis, tabakas, vilnamedis, dobilai, liucerna, motiejukai ir kt. Naudojant

dirbtinius poliploidus, daugiausia pasiekta dobilų, cukrinių runkelių, šilkmedžių, rugių selekcijoje.

Lietuvos žemdirbystės instituto selekcininkai irgi sukūrė įvairių augalų tetraploidų: raudonųjų dobilų veisles 'Vyliai' ir 'Kiršinai', svidrės veisles 'Sodrė' ir 'Žvigilė', tikrųjų eraičinų veislę 'Dotnuva I', vikius.

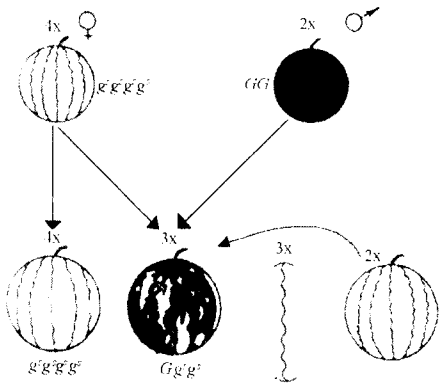
Dauginant poliploidus lytiniu būdu, reikalinga ilga atranka, kol pavyksta gauti stabilią mejozę, todėl ieškoma būdų, kaip sukurti nesikryžminimo barjerą tarp diploidų ir poliploidų. Pavyzdžiui, kukurūzų genome aptiktas genas *Ga*, dėl kurio diploidinių kukurūzų žiedadulkės nedygsta ant tetraploidinių augalų purkos.

Selekcijoje naudojami ir vegetatyviškai dauginamų augalų anortoploidai, pavyzdžiui, triploidinės drebulės, eglės, šilkamedžiai, arbatkrūmiai, obelys (apie ¼ jų veislių yra triploidai) ir kt. Gamyboje įdiegti ir lytiniu būdu dauginamų augalų triploidai, kai jie auginami ne sėklinei produkcijai gauti: triploidiniai cukriniai ir pašariniai runkeliai, turnepsas, agurkai, arbūzai ir kt. Antai triploidinių arbūzų vaisiai ne tik saldesni už diploidų, bet ir neturi sėklų. Cukrinių runkelių triploidai, palyginti su tos pačios veislės diploidais, turi 0,3–1,0% daugiau cukraus. Be to, jų stambesnės šaknys.

Triploidų sėklininkystės ypatumai. Triploidų sėklai gauti reikia nuolat tetraploidus kryžminti su diploidais pagal jau nagrinėtą kryžminimų derinį:

$$\mathbf{4n} \times \mathbf{2n} \quad \text{arba} \quad \mathbf{2n} \times \mathbf{4n}$$
$$\mathbf{3n} \qquad\qquad \mathbf{3n}$$

Net arbūzų, kuriuos kryžminti pagal žiedo sandarą nelabai sudėtinga, hibridams gauti įdedama daug darbo ir išauginamas ribotas triploidinių sėklų kiekis, todėl triploidai žymimi genais žymekliais. Augalams leidžiama laisvai apsidulkinti, ir pagal žymeklius atrenkami triploidai. Pavyzdžiui, žymekliai yra genai, nuo kurių priklauso arbūzų vaisių spalva: tetraploido, kurio genotipas $g^1g^1g^2g^2$, vaisiai yra šviesiai žali su siauromis juostelėmis; diploido, kurio genotipas ***GG***, vaisiai yra žalios spalvos be juostelių, triploido Gg^1g^2 vaisiai yra dėmėti (žalios spalvos su tamsiai žaliomis vingiuotomis juostomis). Auginant diploidus ir tetraploidus kartu, tereikia atrinkti augalus margais vaisiais (6.4 pav.). Jie yra triploidai.



6.4 pav. **Arbūzų triploidinių (3x) hibridų atranka, pasinaudojant genu-žymekliu**

Autopoliploidijos reikšmė evoliucijai. Poliploidinių rūšių eilės. Kadangi poliploidai yra gyvybingesni, atsparesni nepalankiems aplinkos veiksniams, poliploidinės rūšys nepalankiomis sąlygomis dažnai išstumia diploidines rūšis. Pavyzdžiui, Špicbergene, kur sąlygos itin blogos, 80% visų augalų yra poliploidai. Tačiau grynai autopoliploidinių rūšių yra nedaug, dažniau autopoliploidija derinasi su aloploidija. Taip susidaro poliploidinės eilės, kaip antai kviečių:

I. *Triticum monococcum* – 2n = 14
II. *T. durum, T. dicoccum, T. turgidum, T. polonicum* – 2n = 28
III. *T. aestivum, T. compactum, T. spelta* – 2n = 42

Taigi bazinis (X) visų kviečių rūšių chromosomų skaičius yra 7. Paprastieji kviečiai (*T. aestivum*) turi 3 genomus A, B ir D (žr. toliau ir 6.11 pav.).

Poliploidinės eilės žinomos ir gyvūnų (pvz., varlių *Ceratophrididae*, silkių ir karpinių žuvų). Tarakonas *Blatta germanica* (prūsokas) turi 24 chromosomas, o *B. orientalis* – 48.

6.3.1.2. Alopoliploidija. Tolimoji lytinė hibridacija. Somatinių ląselių hibridizacija

Alopoliploidai gaunami sujungus (suliejus) du skirtingus genomus. Sujungimo būdai yra du: tolimoji lytinė hibridizacija ir somatinių ląstelių suliejimas.

Pastaruoju būdu gali būti gaunami ir autopoliploidai, jeigu suliejamos to paties genomo ląstelės.

Tolimoji lytinė hibridizacija. Taikomaisiais tikslais anksčiau tolimąja hibridizacija buvo daugiau domimasi negu dabar. Ypač daug buvo padaryta Rusijoje.

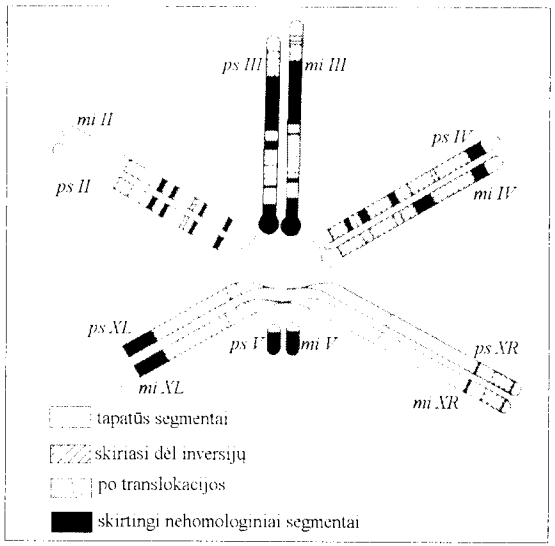
Rūšių nesikryžminimas. Kai kurie I. Mičurino sukurti būdai tolimiesiems hibridams gauti, ypač būdai rūšių ir genčių nesikryžminimui įveikti (vegetatyvinio suartinimo, apvaisinimo žiedadulkių mišiniu, tarpininko), nors ir nėra perversmas moksle, bet verti gilesnių tyrimų.

Nesikryžminimas yra vienas iš rūšies kriterijų, iš kurio sprendžiama, ar yra dvi savarankiškos rūšys, ar tos pačios rūšies skirtingos formos. Dažniausiai rūšys nesikryžmina.

Norint nustatyti rūšį, šio kriterijaus suabsoliutinti negalima. Kai kurių augalų genčių (*Salix, Populus* ir kt.) rūšys labai lengvai kryžminasi. Gali nesikryžminti ir tos pačios rūšies skirtingos populiacijos, formos, rasės. Vienaip ar kitaip rūšiai atsirasti būtina izoliacija (nesikryžminimas). Nesant nesikryžminimo barjero, rūšys išnyktų, kaip ir atsiradusios naudingos formos. Besiporuodamos su senomis, „ištirptų“ tarp senų formų.

Negyvybingi ir sterilūs hibridai gali būti dėl įvairių priežasčių, net dėl motinos organizmo įtakos – **motininio efekto.** Šį barjerą pavyksta įveikti auginant augalų gemalą izoliuotai nuo endospermo, o gyvūnų gemalą transplantuojant į kitą motininį organizmą arba atliekant abipusius kryžminimus. Abipusių kryžminimų skirtumai atsiranda ir dėl to, kad **citoplazma neatitinka branduolio genų,** taip pat dėl **citoplazminių genetinių struktūrų, citoplazmai jautrių genų** ir net **judriųjų genomo elementų** (taip yra drozofilos populiacijose).

Branduolio vaidmuo daugiaplanis. Pirmiausia **nesutampa genomai**. Jie nehomologiniai. Tačiau nesikryžmina ir artimos rūšys, kurių didžioji genomo dalis yra homologinė. Pvz., taip yra tarp dviejų artimų drozofilos rūšių *Drosophila pseudoobscura* ir *D. miranda*. Jų nesikryžminimą sąlygoja **chromosomų mutacijos** – inversijos ir translokacijos (6.5 pav.).



6.5 pav. **Dviejų drozofilos rūšių *D. pseudoobscura* ir *D. miranda* genomų palyginimas**

Tolimosios hibridizacijos/alopoliploidijos pamatus sukūrė G. Karpečenka. Jis išsprendė pagrindines tolimosios hibridizacijos problemas:

- kodėl tolimieji hibridai sterilūs,
- kaip atkurti jų vaisingumą.

Amfihaploidai ir amfidiploidai. G. Karpečenka pagarsėjo ir tuo, kad sukūrė naują vaisingą augalų gentį ***Raphanobrassica***. Jis sukryžmino ridiką (*Raphanus sativus*) su kopūstu (*Brassica oleracea*). Nors abu augalai priklauso skirtingoms gentims, bet turi po vienodą diploidinį chromosomų skaičių (2n = 18):

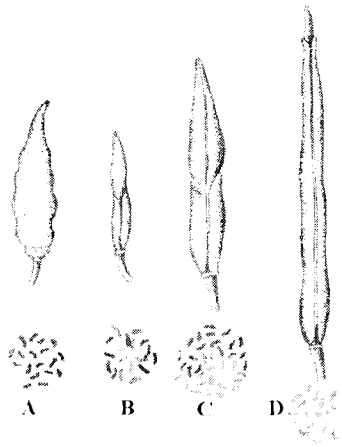
P ***Raphanus*** **(R) × *Brassica* (B)**
2n = 18 2n = 18
Gametos 9 **R** 9 **B**
F_1 18 (9**R** + 9**B**)

F_1 hibridai buvo sterilūs. Nors iš kopūsto ir ridiko jie paveldėjo po 9 chromosomas, bet jos nehomologinės, todėl negalėjo vykti mejozė, nesusidarė lytinės ląstelės. Kadangi šie augalai turėjo po haploidinį abiejų rūšių chromosomų rinkinį, jie vadinami **amfihaploidais** (gr. *amphi* – iš abiejų pusių, *haploos* – paprastas), bet iš tikrųjų buvo du, tik skirtingi chromosomų rinkiniai, todėl jie vadinami ir **alodiploidais** (gr. *allos* – kitas).

Vis dėlto G. Karpečenkai pavyko F_1 rasti vieną vaisingą augalą. Ištyrus chromosomas paaiškėjo jo vaisingumo priežastis: augalo ląstelėse buvo ne 18, o 36 chromosomos (6.6 pav.). Šis augalas turėjo po 2 ridiko ir kopūsto chromosomų rinkinius, todėl normaliai vyko mejozė. Toks dvigubas chromosomų skaičius G. Karpečenkos bandyme atsirado atsitiktinai:

F_1 (9**R** + 9**B**) × (9**R** + 9**B**) **Amfihaploidai**
Gametos (9**R** + 9**B**) (9**R** + 9**B**)
F_2 36 (18**R** + 18**B**) **Amfidiploidas**

Tolimųjų hibridų vaisingumas atstatomas F_1 hibriduose padvigubinant chromosomų skaičių. Po to hibridas turės po 2 abiejų rūšių chromosomų rinkinius. Tokie hibridai vadinami **amfidiploidais**, arba **alotetraploidais**.



6.6 pav. ***Raphanobrassica***: *A* – ridikas (*Raphanus*); *B* – sterilus amfihaploidas; *C* – vaisingas amfidiploidas; *D* – kopūstas (*Brassica*) (pagal G. Karpečenko, 1927)

Augaluose šiuo metu chromosomų rinkinių skaičius nesunkiai padvigubinamas sukeliant poliploidiją kolchicinu.

Tolimieji gyvūnų hibridai nėra sensacija (nors apie juos mėgstama rašyti laikraščiuose), bet retesni. Dažniausiai jie yra sterilūs, todėl jų panaudojimo galimybės ribotos. Pritaikyti poliploidiją jų vaisingumui atkurti negalima. Pagrindinė jų sterilumo priežastis ta pati – genomų neatitikimas. Vis dėlto kartais ir nevaisingi gyvūnų tolimieji hibridai yra naudingi. Jie auginami dėl hibridų heterozės, pvz., arklio × asilo hibridas mulas, nes yra labai ištvermingas, stiprus. Šiomis savybėmis lenkia abu tėvus.

Kartais sterilumo išvengiama abipusiais kryžminimais. Kaip įrodė G. Karpečenka, sterilumas atsiranda ir kai tėvo branduolys neatitinka motinos citoplazmos.

G. Karpečenka ir jo bendradarbė S. Šavinskaja (1935) atrado reiškinį, kuris buvo pakartotinai atrastas tik po daugelio metų. Tai **chromosomų eliminacija**. Kai kopūstas buvo kryžminamas su ridiko-kopūsto amfidiploidu, palikuonys buvo tik kopūsto fenotipo:

P 18 **B** × (18 **R** + 18 **B**)
Gametos 9 **B** (9 **R** + 9 **B**)
Turėjo būti – (18 **B** + 9 **R**),
iš tikrųjų buvo 18B – visi augalai kopūsto fenotipo.

Šių augalų genotipui patikrinti jie (tėvas) buvo sukryžminti su įvairiomis kopūsto formomis (motina):

18 **B įvairios kopūsto formos × kopūsto fenotipo hibridas (18 B?)**
Gametos 9 **B** 9 **B(?)**
Palikuonys 18 **B**

Visi palikuonys buvo su dominuojančiais kopūsto požymiais, t. y. su 18 B chromosomų. Vadinasi, visiškai eliminavosi ridiko chromosomos.

Tolimųjų hibridų savybės. Tolimiesiems hibridams būdingi įvairūs mejozės, apsivaisinimo, taip pat požymių paveldėjimo nukrypimai. Neretai hibridai labai panašūs į motininę rūšį. Jeigu tai kartojasi ir kitose kartose, galima įtarti, kad hibridai dauginasi partogenezės arba ginogenezės (arba augalų – apomiksės) būdu.

Tipiškais lytinio dauginimosi atvejais dėl F_1 hibridų nenormalios mejozės F_2 požymiai paveldimi labai sudėtingai. Retokai požymiai paveldimi pagal Mendelio dėsnius. Paprastai F_2 tolimieji hibridai būna labai įvairūs; pasitaiko individų su visiškai naujais požymiais, labai dažnos mozaikos. Dėl netaisyklingos mejozės vyksta dar vienas reiškinys: **tarp tolimųjų hibridų palikuonių dažnai pasitaiko aneuploidija**.

Iš tolimųjų hibridų vaisingumo ir homologinių chromosomų konjugacijos mejozėje sprendžiama apie genotipinę rūšių giminystę. Kartais tolimieji hibridai būna vaisingi be chromosomų padvigubėjimo. Tai gali būti dėl dviejų priežasčių: a) rūšys yra bendros kilmės ir genetiškai labai artimos; b) klaidingai dvi skirtingos tos pačios rūšies formos laikomos rūšimis.

Hibridinės rūšys. Amfidiploidai dažniausiai daug gyvybingesni, geriau prisitaikę prie aplinkos sąlygų už pradines rūšis. Jiems palankesnė gamtinė atranka. Dėl to gamtoje atsiranda hibridinių rūšių. Jų genetinė sandara gali būti labai sudėtinga. Kartais jos sudarytos ne iš 2, o 3–4 nevienodų genomų. Kai organizmas turi 3 skirtingus genomus, jis yra aloheksaploidas (6n). Būtent tokie yra paprastieji kviečiai (*Triticum aestivum*) su trimis genomais (žr. toliau, 6.11 pav.). Šie genomai turi daug bendrų genų.

Iš alopoliploidų kilo daug augalų rūšių, ypač žemės ūkio: kviečių, vilnamedžio, bulvių ir kt. Alopoliploidinės rūšys tarp gyvūnų retesnės, bet pasitaiko, pavyzdžiui, silkių, karpinių žuvų. Tokios gyvūnų rūšys dažniausiai dauginasi partenogenetiškai. Partenogenezė-ginogenezė tokioms rūšims yra būtinybė, nes poliploidija dažnai pažeidžia gyvūnų lytį.

Žinant hibridinės rūšies kilmę, be rūšies pavadinimo, skliaustuose dažnai nurodomos tėvinės rūšys, pvz., pilkoji tuopa – *Populus canescens* (*P. alba* × *P. tremula*).

Rūšių resintezė. 1932 m. švedų genetikas Miuncingas (A. Müntzing) sukryžmino dvi aklės rūšis: geltonąją aklę (*Galeopsis speciosa*) su plaukuotąja akle (*G. pubescens*). F_2 jis gavo alotriploidinį hibridą, panašų į dirvinę aklę (*G. tetrahit*), todėl šis hibridas buvo pavadintas *G. pseudotetrahit*. Jį sukryžminus su plaukuotąja akle (*G. pubescens*) gautas alotetraploidas visais atžvilgiais, net chromosomų morfologija tapatus dirvinei aklei (*G. tetrahit*). Su šia rūšimi alotetraploidas laisvai kryžminosi, hibridai buvo vaisingi.

Tuo pačiu metu V. Rubinas atkūrė naminės slyvos (*Prunus domestica*, 2n = 48) istoriją. Jis sukryžmino skėstašakę slyvą (*P. divaricata*, 2n = 16) su dygiąja slyva (*P. spinosa*, 2n = 32). Tarp hibridų buvo vienas augalas amfidiploidas (48 chromosomos), visiškai panašus į naminę slyvą (*P. domestica*).

Vadinasi, tolimoji hibridizacija padeda nustatyti įvairių rūšių kilmės istoriją, pakartotinai atkuriant rūšį.

Tolimoji hibridizacija/alopoliploidija augalų selekcijoje. Dėmesys tolimajai hibridizacijai pastaruoju metu gerokai atslūgęs. Mat ją labai sėkmingai išstumia **genų inžinerija.**

Žemės ūkio augalų ir naminių gyvūnų giminaičiai laukinės rūšys turi daug vertingų genų: atsparumo ligoms ir vabzdžiams, nepalankiems ekologiniams veiksniams ir pan. Juos perkelti į naudojamų augalų ir gyvūnų genomą ne vieno genetiko svajonė, kaip ir genus, lemiančius kviečių daugiametiškumą. Tačiau sukryžminus kad ir kviečius su varpučiu, suliejami abiejų augalų genomai, tuo tarpu domina tik pavieniai genai. Be to, laukinės rūšys turi daug dominuojančių genų, todėl hibridas panašus į laukinę rūšį, pvz., į varputį. Kviečio savybių nedaug išlieka. Kokia nauda iš tokio hibrido? Reikia daug kartų atlikti grįžtamuosius kryžminimus, norint vėl gauti ne ką kita, o kvietį.

Genų inžinerijos metodais perkeliama tik dalis genomo – pageidaujami genai.

Tačiau būtų klaida „nurašyti" alopoliploidiją kaip genetikos-selekcijos metodą. Tolimoji hibridizacija gali būti tiesiogiai taikoma kuriant naują hibridinę rūšį ar net gentį. Taip sukurta nauja gentis kvietrugis (*Triticale*). Ji yra kviečio (*Triticum*) ir rugio (*Secale*) hibridas.

Alopoliploidija yra svarbi kaip **genetinės analizės metodas**:

- rūšių kilmei tirti, jų genomams atkurti;
- augalų monosominėms ir nulisominėms linijoms sukurti (žr. toliau); pasinaudojama tolimuosiuose hibriduose dažna aneuploidija;
- norint pakeisti vienos rūšies chromosomą kitos rūšies ar genties chromosoma, t. y. gauti linijas su pakeista viena chromosoma;
- haploidams ir polihaploidams sukurti.

Lietuvoje kvietrugį sukūrė J. Bulavas. A. Sliesaravičius ir S. Nekrošas sukūrė naują pašarinių žolių veislę 'Punia', kuri yra tarpgentinis eraičino (*Festuca pratensis*) ir svidrės (*Lolium multiflorum*) hibridas (*F. pratensis* × *L. multiflorum*). Abu tėvai buvo tetraploidai. Tai palengvino gauti hibridus.

Somatinių ląstelių hibridizacija (būdas alopoliploidams ir aneuploidams gauti). Somatinės ląstelės spontaniškai susilieja retai, todėl jų susiliejimą aptiko tik 1960 m. vienu metu keli mokslininkai.

Kaip gaunami somatinių ląstelių hibridai? Labai svarbi kliūtis somatinėms ląstelėms susilieti yra **ląstelės apvalkalėlis** (augalų – sienelė). Kad ląstelės susilietų, jų apvalkalėlis pašalinamas. Pradžioje gyvulinių ląstelių apvalkalėliui suardyti buvo naudojamas Sendėjaus viruso galvučių preparatas. Šis virusas sukelia hemagliutinaciją, ardydamas ląstelių apvalkalėlį. Jo galvutėje yra fermentų.

Vėliau šiems tikslams surasta fermentų; dažnai naudojamas polietilenglikolis. Augalų sienelė sudaryta iš celiuliozės arba hemiceliuliozės. Suardoma ją skaidančiais fermentais, polietilenglikoliu.

Ląstelės, kurioms pašalintas apvalkalėlis/sienelė, vadinamos **protoplastais.**

Dvi susiliejusias ląsteles reikia atskirti ir pažinti. Tam tikslui naudojamos selektyvios terpės. Paprasčiausia hibridines ląsteles atskirti, jeigu ir vienas, ir antras organizmai, kurių somatinės ląstelės suliejamos, nesintetina kokių nors skirtingų medžiagų. Pavyzdžiui, vienas nesintetina hipoksantino (***hyp***$^-$), o kitas leucino (***leu***$^-$). Terpėje be šių medžiagų gali augti tik hibridinės ląstelės, nes pirmojo organizmo genotipas ***hyp***$^-$***hyp***$^-$***leu***$^+$***leu***$^+$, o antrojo – ***hyp***$^+$***hyp***$^+$***leu***$^-$***leu***$^-$. Hibridinės ląstelės yra tetraploidinės ir ***hyp***$^+$***hyp***$^+$***hyp***$^-$***hyp***$^-$***leu***$^+$***leu***$^+$***leu***$^-$***leu***$^-$ genotipo, taigi sugeba sintetinti abi medžiagas.

Hibridinės ląstelės aptinkamos ir kitokiais metodais: genetinės komplementacijos, citogenetiniais, biocheminiais, ypač pagal izozimų (izofermentų) spektrus ir kt.

Somatinių ląstelių hibridizacijos ribos. Sulieti kuo labiau nutolusių organizmų protoplastus vienu metu (apie 1965–1970 m.) buvo net madinga. Sulietos skirtingų klasių ir tipų gyvūnų somatinės ląstelės: vištos + žiurkės, uodo + žmogaus, taip pat skirtingų augalų šeimų ląstelės: miežių + sojos, kukurūzų + sojos, ropių + sojos ir

kt. Ląstelių suliejimo ribos iš tiesų labai plačios, nes gauti somatinių ląstelių hibridai net tarp augalų ir gyvūnų. Sulieti mielių ląstelių ir žiurkės eritrocitų, tabako ir žmogaus vėžinių HeLa ląstelių protoplastai. Tokios ląstelės išgyveno kelias dienas ir net susidarė apvalkalėlis. Morkų ir žmogaus HeLa ląstelių hibridas net dalijosi!

Ir vis dėlto riba yra. Ji priklauso ne nuo galimybės sulieti protoplastus, o nuo **chromosomų eliminacijos**. Hibridinėse ląstelėse, gautose tarp nutolusių taksonų, vieno kurio konkretaus taksono chromosomos pasišalina – eliminuojasi.

Chromosomų eliminacija (sinonimas chromosomų **segregacija**) būdinga ne tik tolimiesiems somatinių ląstelių hibridams, bet ir kai kuriems vidurūšiniams jų hibridams.

Kaip minėta, suliejus somatines ląsteles, chromosomos eliminuojasi tam tikra kryptimi:

žmogaus+pelės – eliminuojasi **žmogaus** chromosomos;
žmogaus+žiurkės – **žiurkės** chromosomos ir kt.

Chromosomų eliminacijos kryptį galima pakeisti. Tai indukuojamas reiškinys. Eliminaciją sukelia jonizuojančioji ir ultravioletinė spinduliuotė.

Norimo eliminuoti genomo ląstelės švitinamos. Sulietose somatinėse ląstelėse eliminuojasi švitintos chromosomos nepriklausomai nuo įprastos eliminacijos krypties. Antai paveikus jonizuojančiąja spinduliuote pelės ląsteles, „žmogaus + pelės" ląstelių hibriduose eliminuojasi pelės chromosomos.

Gana dažnai eliminuojasi ne visas genomas, o tik dalis jo. Kartais išlieka tik pavienės chromosomos. Šis reiškinys pritaikomas, norint:

- nustatyti sankibos grupę;
- gauti asimetrinius hibridus (iš tikrųjų aloaneuploidus).

Terminologija ir somatinių ląstelių hibridų kariotipo ypatumai. Somatinių ląstelių hibridizacija, kitaip negu lytinė hibridizacija, žymima ne daugybos (×), o sudėties ženklu (+) arba daugybos ženklu apskritime. Somatinių ląstelių hibridai gali būti heterozigotiniai pagal genus, esančius ne tik branduolyje, bet ir citoplazmoje. Mat suliejamos dvi ląstelės, kurios abi turi citoplazmą (apsivaisinant lytiniu bū-

du, zigotoje citoplazma būna tik iš kiaušialąstės), tuo tarpu vieno iš branduolių chromosomos išnyksta. Tokie organizmai (arba ląstelės) vadinami **citoplazminėmis heterozigotomis**, arba **citohetomis**. Hibridai pagal citoplazminius paveldimumo vienetus vadinami **cibridais**, arba **citoplazminiais hibridais**.

Suliejus dvi somatines ląsteles, chromosomų hibridinėje ląstelėje padvigubėja, kaip ir apsivaisinant lytiniu būdu. Kai pradinės ląstelės diploidinės, somatinių ląstelių hibridas yra tetraploidinis, o kai haploidinės – diploidinis.

Kai chromosomų eliminacija nevyksta, iš karto gaunamas alopoliploidas.

Tačiau taip ne visuomet būna. Gyvūnų ląstelių hibridų paprastai eliminuojasi vienos rūšies chromosomos, dėl to ląstelės virsta diploidinėmis arba, išlikus pavienėms kitos rūšies chromosomoms, – asimetriniais hibridais, arba aneuploidinėmis.

Somatinių ląstelių hibridizacijos naudojimas. Šiuo metu somatinių ląstelių hibridizacija (**paraseksualinė hibridizacija**) taikoma norint:

- **greičiau gauti hibridus tarp genčių ir rūšių, tarp kurių galima lytinė tolimoji hibridizacija**. Suliejus dvi diploidines somatines ląsteles, iš karto gaunamas amfidiploidas. Sėkmingai tai pavyksta padaryti tik tarp tų rūšių ir genčių, kurias galima sukryžminti lytinės hibridizacijos būdu. Tokiu būdu, pvz., gauti tarprūšiniai bulvių, tabako, petunijos amfidiploidai;
- **pagreitintai gauti hibridus tarp kelių organizmų;**
- **gauti asimetrinius hibridus,** kurie, be viso vieno tėvų chromosomų rinkinio, turi daugiau ar mažiau kito organizmo chromosomų. Asimetriniams hibridams atsirasti būtina chromosomų eliminacija. Tai greičiausias būdas pavienėms chromosomoms perkelti iš vieno genomo į kitą;
- **nustatyti genų sankibos grupę**. Sėkmingiausiai pritaikyta žmogaus genomui tirti. Irgi būtina chromosomų eliminacija;
- **gauti hibridines somatinių ląstelių linijas**. Jos auginamos izoliuotai dirbtinėse terpėse (pvz., ženšenio); gali būti naudojamos kaip vertingų medžiagų (dažniausiai vaistinių) naujų derinių **producentai**;
- **gauti hibridomas** – ląsteles, kurios gamina monokloninius antikūnus. Tai nėra tolimieji hibridai. Suliejamos vėžinė (paprastai

mielomos arba melanomos) ir blužnies (B limfocitų) ląstelės. Pirmoji ląstelė hibridomai suteikia neribotą gebėjimą dalytis, o antroji ląstelė imama iš gyvulio, kuriam prieš tai buvo suleistas antigenas. Ši ląstelė gamina specifinį reikalingą antikūną. Kadangi jis gaminamas vieno ląstelių klono, todėl turi tik vieno tipo imunoglobulinus (konkrečiam antigenui). Tokie antikūnai vadinami monokloniniais. Juos galima panaudoti tiesiogiai kaip vakcinas, bet dažniausiai naudojami grynoms medžiagoms išskirti iš jų mišinio. Šiam tikslui gyvuliui, iš kurio bus imama blužnies ląstelė, suleidžiamas antigenas – medžiaga, kurios atžvilgiu norima sukurti monokloninį antikūną. Išskirti iš hibridomos klono ląstelių antikūnai imobilizuojami į chromatografinę kolonėlę, ir ši pasirinktinai (selektyviai) sulaiko reikalingą medžiagą;
- **tirti nebranduolinį paveldimumą, gauti cibridus**. Tačiau nebranduolinių genetinių struktūrų santykiai somatinių ląstelių hibriduose (cibriduose) nepakankamai ištirti. Atrodo, kad tolimuosiuose somatinių ląstelių hibriduose gali eliminuotis ir nebranduolinės genetinės struktūros;
- **augalų morfoontogenetikoje tirti augalo organo raidą**. Šiuo atžvilgiu labai įdomūs augalai „pabaisos“, gaunami suliejus maksimaliai tolimų taksonų somatines ląsteles. Ukrainiečiui J. Glebai pavyko gauti tarptribinius vairenio (*Arabidopsis thaliana*) ir turnepso (*Brassica rapa*) hibridus. Tai iš tikrųjų „pabaisos“. Keistai nuaugę augalai: vien stiebas be šaknų, tai vien šaknys be stiebo. Jie sėklų nemezga, bet galima tirti jų ląstelių kultūras arba iš šių ląstelių toliau regeneruoti „pabaisas“;

- **tirti** ne tik augalų, bet ir gyvūnų ląstelių diferenciaciją. Tarp jų ir žinduolių. Nustatytas įdomus reiškinys. Kai sulicjamos dviejų skirtingų žinduolių ląstelės, pvz., žiurkės ir pelės, vadinamieji „namų ūkio“ genai išlieka veiklūs. Tie genai, kurie suteikia somatinei ląstelei savitų savybių, lemia diferenciaciją, yra slopinami. Šis reiškinys vadinamas **ekstinkcija**.

6.3.1.3. Haploidai

Haploidija (gr. *haploos* – vienišas, paprastas + *eidos* – vaizdas) – reiškinys, kai organizmas, ląstelė ar branduolys turi tik vieną chromosomų rinkinį 1n. Organizmas, kurio ląstelės turi 1n, vadinamas **haploidu**, arba **monoploidu**, ląstelės ir branduoliai – **haploidiniais**.

Prokariotai pagal genomo sandarą yra haploidai.

Daugeliui žemesniųjų eukariotų, ypač grybų, žaliadumblių, kokcidijų haploidija yra normali būsena. Jų gyvenimo cikle vyrauja **haplofazė**. Jų diplofazė tik viena ląstelė – zigota. Kylant evoliucijos laiptais, haplofazė redukavosi. Gaubtasėklių haplontą sudaro tik trys subrendusios mikrosporos ląstelės ir septynios antrinio gemalinio maišelio ląstelės. Daugelio gyvūnų haplofazė – tai generatyvinės ląstelės po redukcinio dalijimosi.

Kai kurių gyvūnų (žemesniųjų vėžiagyvių, plėviasparnių) kaitaliojasi lytinės kartos su partenogenetinėmis kartomis. **Partenogenezė** (gr. *parthenos* – nekalta mergina) – vystymasis be apsivaisinimo, todėl dažnai partenogenetinė karta yra haploidinė. Pasitaiko gyvūnų, kurių lytį lemia haploidinis-diploidinis chromosomų skaičius. Partenogenezė būdinga tik vienai jų lyčiai. Pvz., bitė motinėlė leidžia neapvaisintus kiaušinėlius pro rezervuarą su sperma. Jie apvaisinami ir yra diploidiniai. Iš jų išsivysto bitės darbininkės ir bitė motinėlė, t. y. moteriška lytis. Kita dalis bitės neapvaisintų kiaušinėlių nepatenka į rezervuarą su sperma. Jie yra haploidiniai. Iš jų išsivysto vyriška lytis tranai. Partenogenetinė karta gali būti ir diploidinė, jeigu susidarant lytinėms ląstelėms nevyksta redukcinis dalijimasis arba po to susilieja du haploidiniai branduoliai. Prisiminkime ir tai, kad bičių tranų somatinėse ląstelėse atsiranda diploidinis chromosomų skaičius. Taigi partenogenezė su haploidija gali nesutapti.

Tų organizmų, kurių cikle haploidija (išskyrus lytines ląsteles ir gametofitą) nėra normalus reiškinys, natūraliai haploidai atsiranda retai. Net aukštesniųjų augalų haploidų dažnis yra tik 1×10^{-5}–1×10^{-6}. Todėl specialiai kuriami metodai haploidams gauti.

Haploidų gavimo būdai. Dažniausiai gaunami augalų haploidai. Kryžminant dvi skirtingų genomų rūšis arba gentis, galima gauti **amfihaploidus**. Jie būna ir suliejus skirtingų genomų haploidines somatines ląsteles (dažniau amfihaploidines, norint gauti vadinamuosius poliamfihaploidus).

Paprasti vieno genomo haploidai, t. y. **monoploidai,** gaunami keturiais būdais. Du iš jų taikomi palyginti seniai:

- **dirbtinės partenogenezės ir ginogenezės būdu** sužadinamas gemalo vystymasis iš neapvaisinto kiaušinėlio (kiaušialąstės). Sužadinama įvairiai: cheminėmis medžiagomis, šiluminiu šoku, jonizuojančiąja spinduliuote užmuštomis augalų žiedadulkėmis ir kt.;
- **dvynių metodu**: retkarčiais iš kai kurių augalų rūšių vienos sėklos išauga du augalai. Viename sėklapradyje išsivysto du gemalai (susidaro du gemaliniai maišeliai, gemalas vystosi ne tik iš kiaušląstės, bet ir iš sinergidės ir t. t.). Tokie augalai vadinami dvyniais. Vienas dvynys dažniausiai yra triploidas, bet kartais pasitaiko ir haploidas. Pasak Miuncingo, tarp dvynių yra 0,5% haploidų.

Augalų haploidams gauti šiuo metu taikomi du veiksmingesni ir produktyvesni būdai.

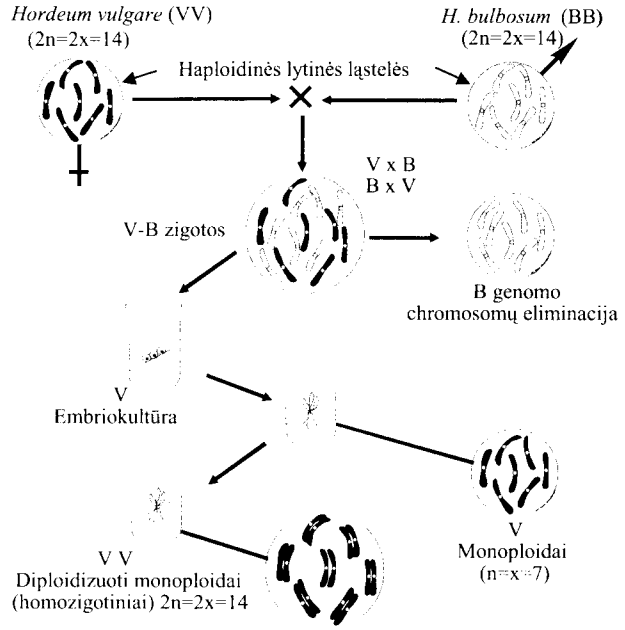
Haploidai iš žiedadulkių. Tai dažniausiai taikomas būdas. Jį atrado 1964 m. du Indijos mokslininkai Guša (S. Gusha) ir Magešvaris (S. L. Maheshwari).

Haploidai iš žiedadulkių gaunami pasodinus nesubrendusias dulkines, kurių mikrosporose vyksta pirmasis dalijimasis, steriliai ant izoliuotų audinių auginimui skirtos kietos mitybinės terpės paviršiaus. Po ilgesnio laiko dulkinė atsiveria, ir žiedadulkės pradeda dygti. Iš pradžių susidaro kalius, o iš jo regeneruoja visas augalas. Augalėliai perkeliami į naują terpę, vėliau į dirvą. Būtina patikrinti regenerantų chromosomas. Pasitaiko ir diploidų bei poliploidų. Atranka būtina taikant bet kurį būdą haploidams gauti. Labai svarbu parinkti momentą ir augalų hormonus, kuriais sutrikdoma normali įvykių eiga mikrosporoje. Tada jos ląstelės pradeda nereglamentuotai dalytis. Labai lengvai regeneruoja tabako žiedadulkės. Sunku išauginti augalus iš varpinių augalų žiedadulkių.

Chromosomų eliminacija iki haploidinio skaičiaus. Nors šis būdas irgi taikomas augalų haploidams gauti, bet šitaip galima gauti ir haploidines gyvūnų, tarp jų ir žinduolių, ląsteles. Sujungiami du skirtingi augalų genomai (tolimosios lytinės ar somatinės hibridizacijos būdu). Tik svarbu, kad vyktų chromosomų eliminacija ir eliminuotųsi būtent nereikalingas genomas. Antai miežiai (*Hordeum vulgare*) kryžminami su laukine miežių rūšimi *H. bulbosum* arba net su kukurūzais (*Zea mays*). Po chromosomų eliminacijos išlieka tik *H. vulgare* genomas. Gaunami miežių *H. vulgare* haploidai (6.7 pav.).

Izogeninės augalų linijos. Nepriklausomai nuo to, kaip gaunami dirbtiniai haploidai, jie yra labai silpni ir sterilūs, todėl jų chromosomų skaičius padvigubinamas iki diploidinio. Taip atkuriamas jų vaisingumas. Tam tikslui augalai paveikiami kolchicinu.

27. 1313



6.7 pav. **Miežių monoploidų gavimas tarprūšinio kryžminimo metodu** (pagal A. Sliesaravičių, 1992)

Iš haploidų gauti diploidiniai augalai yra genetiškai gryni – homozigotiniai pagal visus genus, t. y. pagal visą genomą. Taip gaunamos vadinamosios **izogeninės** linijos.

Paprastai nurodoma, kad yra beveik izogeninė linija. Tas „beveik" atsiranda dėl to, kad regenerantuose gali įvykti genų mutacijos, ir tada pagal pavienius genus augalas bus heterozigotinis.

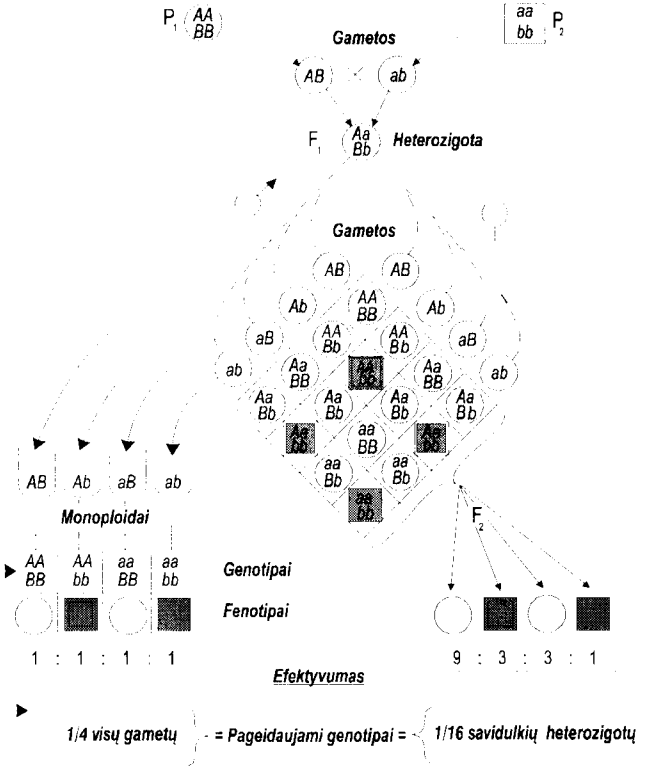
Homozigotines linijas gauti yra vienas iš augalų ir gyvūnų selekcijos uždavinių. Kol nebuvo veiksmingų metodų augalų haploidams gauti, genetiškai gryni, homozigotiniai augalai ir gyvūnai buvo gaunami ilgametės, daugelyje kartų (8–16), įvaisos (inbrydingo) būdu. Taip sukurtos, pvz., vadinamosios kukurūzų **įvaisos linijos**. Įvaisa, kaip būdas genetiškai gryniems gyvūnams gauti, taikoma iki šiol. Dirbtinė įvaisa taikoma tik tiems organizmams, kurie veisiasi autbrydingo būdu. Keliose jų kartose panaudojus įvaisą, išryškėja visi heterozigotinėje būsenoje esantys recesyvieji genai. Bet tai ilgas kelias. Haploidija (augalų) sutrumpina jį beveik dvigubai:

Homozigotų gavimo būdai:

Klasikinis ♀ × ♂ ← Įvaisa → I_1 → I_2 – …I_n ← Įvaisa ir atranka daugelyje kartų (I_6 ir daugiau)

Iš haploidų ♀ × ♂ ← Dulkinių kultūra/chromosomų eliminacija → H – haploidas, haploidų atranka → ↓ ← poliploidija → D – diploidas → ↓ ← Atranka – įvertinimas → Beveik izogeninė linija

Atranka ir įvertinimas būtini ne tik patikrinti, ar tikrai gauti haploidai, bet ir įvertinti izogenines linijas. Nors jos yra ir homozigotinės, bet įvairios, todėl reikia nustatyti, ko jos vertos. Haploidai yra įvairūs todėl, kad heterozigotinių organizmų lytinės ląstelės, iš kurių jie kilę, yra įvairių genotipų (6.8 pav.).



6.8 pav. **Dviejų būdų gauti pageidaujamo genotipo homozigotas palyginimas:** iš haploidų, pvz., žiedadulkių-dulkinių (kairėje); iš lytinės hibridizacijos/dihibridinio kryžminimo (dešinėje) (pagal A. Sliesaravičių, 1992)

6.3.1.4. Aneuploidija (heteroploidija)

Aneuploidija – pavienių chromosomų skaičiaus pokyčiai. Ji atsiranda dėl trijų priežasčių:

- chromosomų neišsiskyrimo keliaujant dukterinėms ląstelėms į polius;
- chromosomų atsilikimo (turi daug bendro su pirmąja priežastimi, irgi netaisyklingai paskirstomos dukterinės chromosomos);
- endoreprodukcijos – reiškinio, kai padvigubėja tik pavienės chromosomos arba jų dalys.

Organizmai, kurie turi pakitusį pavienių chromosomų skaičių, yra vadinami **aneuploidais**.

Gana daug žinių apie aneuploidus yra skyrelyje apie genomo imprintingą. Tai neišvengiama. Aneuploidija yra ir vienas iš būdų genomo imprintingui aptikti. Tačiau ir pati ji pasireiškia priklausomai nuo genomo imprintingo. Tai būdinga **monosomikams** (kurie turi ne dvi, o tik vieną chromosomą).

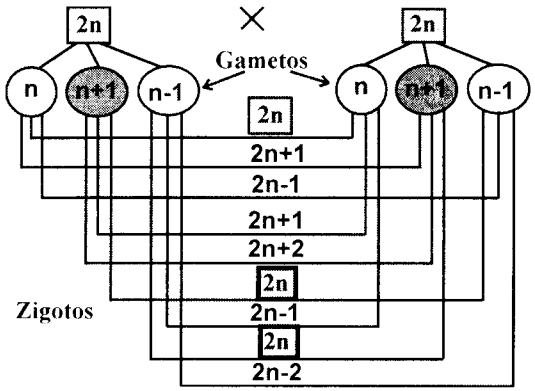
Kai yra genomo imprintingas, monosomikų fenotipas skiriasi priklausomai nuo to, iš ko paveldėta chromosoma – iš tėvo ar motinos.

Be to, genomo imprintingas atskleidė naują aneuploidijos tipą, kai kariotipas normalus, diploidinis, o fenotipas – su nukrypimais nuo normalios būsenos. Tai **disomikai.** Jie yra paveldėję abi homologines chromosomas tik iš motinos arba tik iš tėvo.

Kaip ir kitų mutacijų, aneuploidijos pobūdis priklauso nuo to, kada įvykusi **mutacija**. Kai tai atsitinka somatinėse ląstelėse, atsiranda mozaikos.

Kai aneuploidinės yra lytinės ląstelės, aneuploido tipą daugiausia lemia **apsivaisinimas** (6.9 pav.). Čia galimi du atvejai:

- **vienas arba abu tėvai buvo aneuploidai**, ir aneuploidija priklausys ne tik nuo apsivaisinimo, bet ir nuo to, kokių tipų ir kokiu santykiu susidarys aneuploidinių lytinių ląstelių;
- **aneuploidija atsirado naujai** dėl mutacijos generatyvinėse ląstelėse. Bent žmogaus aneuploidai dažniausiai yra tokie. Mat dauguma žmogaus aneuploidų neturi palikuonių: arba anksti miršta, arba yra nevaisingi.



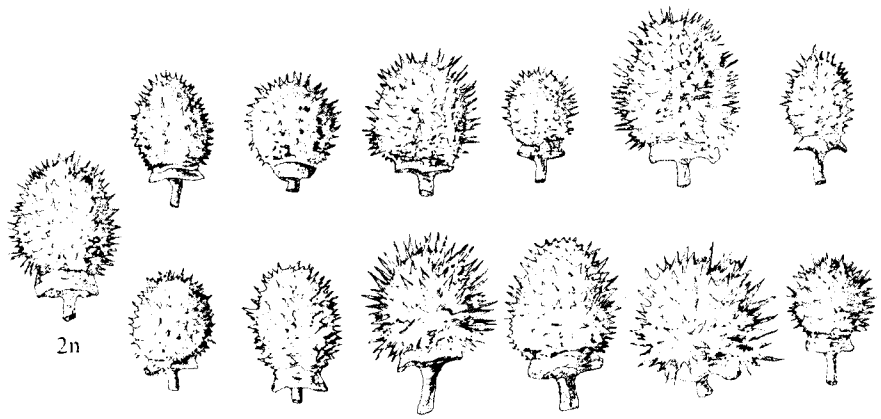
6.9 pav. **Aneuploidijos tipų priklausomybė nuo apsivaisinimo:**
2n – normalus diploidas; 2n – disomikas (abi chromosomos iš motinos arba iš tėvo); 2n–1 – monosomikas; 2n–2 – nulisomikas; 2n+1 – trisomikas; 2n+2 – tetrasomikas

Dažniausiai su aneuploidija susiduriama kaip su nauju įvykiu. O šiuo atveju dauguma lytinių ląstelių yra normalaus kariotipo – **1n**. Taigi nors dalis lytinių ląstelių yra aneuploidinės, didžiausia tikimybė yra normalaus kariotipo vaikui gimti. Kita vertus, jeigu chromosomų skaičius pakinta vykstant redukciniam dalijimuisi, lygiai tiek pat susidaro ląstelių su anomaliniu chromosomų skaičiumi **n + 1** ir **n – 1**. Taip ir pavaizduota 6.9 paveiksle.

Palikuonis aneuploidas bus tada, kai iš dviejų susiliejančių lytinių ląstelių bent viena bus aneuploidinė.

Priklausomai nuo to, kiek yra homologinių chromosomų (pagal tą chromosomą, kurios skaičius pakitęs), skiriami:

- **nulisomikas**, kai vienos chromosomų poros apskritai nėra: **2n – 2** (susiliejo **n – 1** ir **n – 1** ląstelės);
- **monosomikas**, kai kažkuri diploido chromosoma yra tik viena: **2n – 1** (susiliejo **n** ir **n – 1** ląstelės);
- **disomikas**, kai visos diploido chromosomos yra poromis – **2n** (tačiau gali susilieti **n – 1** ir **n + 1** ląstelės; tada kyla problemų dėl genomo imprintingo: vieną chromosomų porą palikuonis turi tik iš tėvo arba tik iš motinos);
- **trisomikas**, kai yra trys tos pačios homologinės chromosomos (susiliejo lytinės ląstelės **n** ir **n + 1**);
- **tetrasomikas**, kai kariotipe yra keturios tos pačios homologinės chromosomos (susiliejo **n + 1** ir **n + 1** ląstelės).



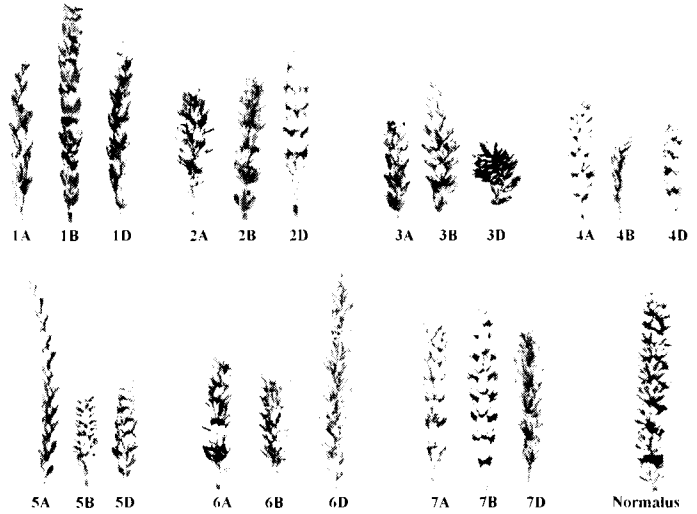
6.10 pav. **Visų durnaropės (*Datura*) chromosomų trisomikai:** kairėje – normalus diploidas (2n = 24)

Gali būti dvigubi (2n + 1 + 1), trigubi (2n + 1 + 1 + 1) ir t. t. trisomikai, dvigubi (2n + 2 + 2), trigubi (2n + 2 + 2 + 2) ir t. t. tetrasomikai, ir atvirkščiai, monosomikai, nulisomikai. Jie gali susidaryti vėžinėse ląstelėse arba tada, kai autopoliploidų mejozė yra nestabili.

Aneuploidų savybės. Blekslis (A. F. Blakeslee) ir Belingas (I. Belling) aptiko ir labai detaliai ištyrė visų 12 durnaropės (*Datura*) chromosomų trisomikus. Visi trisomikai skyrėsi vienas nuo kito morfologinėmis savybėmis, pvz., dėžutės (vaisiaus) forma (6.10 pav.).

Aneuploidai (pvz., visi durnaropės trisomikai) yra ne tokie gyvybingi ir vaisingi. Šios ypatybės priklauso nuo įvairių aplinkybių, pirmiausia nuo aneuploidijos tipo: trisomijos ne tokios žalingos kaip monosomijos arba nulisomijos. Be to, lemia tai, kiek gyvybinėms funkcijoms svarbių genų yra vienoje ar kitoje chromosomoje. Gali turėti įtakos ir chromosomos dydis. Tai būdinga žmogui. Visų 12 stambiųjų žmogaus chromosomų trisomikai žūva negimę, o esant mažųjų (pvz., dvidešimt pirmosios) chromosomų trisomijai, persileidimo gali nebūti. Kai kurių augalų rūšių aneuploidų negyvybingos tik vyriškosios lytinės ląstelės, tačiau paprastųjų kviečių, kurių gauti visų chromosomų nulisomikai (6.11 pav.), 14 nulisomikų sudarė negyvybingas moteriškas gametas, 7 – sterilias žiedadulkes.

Aneuploidijos reikšmė. Monosomikai naudojami chromosomoms kartografuoti, monosomikai ir nulisomikai – vieno organizmo chromosomų porai keisti kito organizmo chromosomų pora.



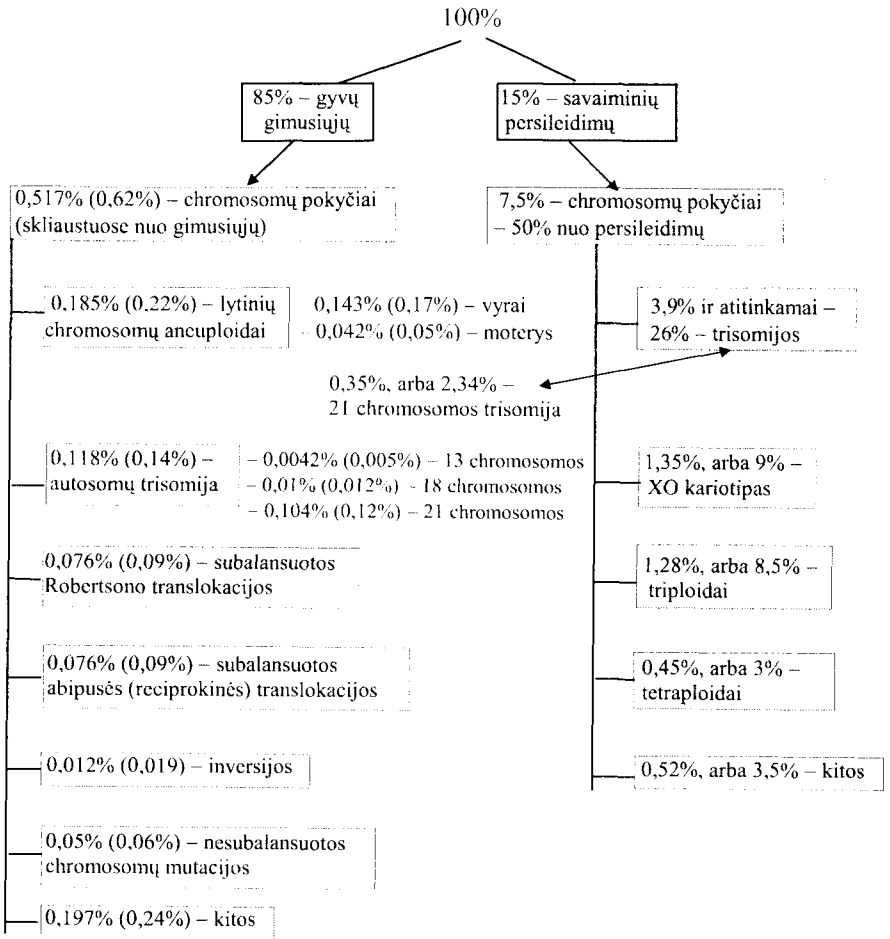
6.11 pav. **Visų kviečio (*Triticum aestivum*) chromosomų nulisomikai:** n=7; *Ti. aestivum* 6x=42; A, B, C – trys heksaploido genomai

Žmogaus aneuploidijos svarba galima įsitikinti iš duomenų, kurie pateikti 6.12 paveiksle. Nors tai senoki duomenys (jis sudarytas pagal K. Sankaranarayanan, 1979 m.), bet jie pakankamai atspindi esamą padėtį. Be to, mutacijų dažniai svyruoja įvairiose populiacijose.

Šiaip ar taip, bet iš visų gimusiųjų vaikų net **3% sudaro aneuploidai**. Tarp savaiminių persileidimų chromosomų pokyčiams tenka apie 50%. Pusė jų yra aneuploidai.

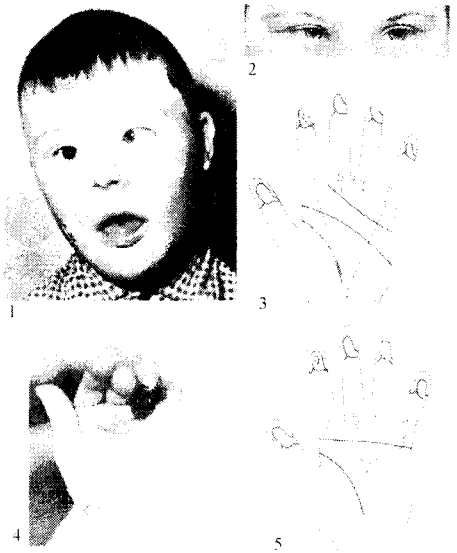
Tiriant žmogaus aneuploidus nustatyta, kad specifiniai požymiai arba **požymių kompleksai (sindromai)** būdingi tik kai kuriems aneuploidams, pvz., X monosomijai, Dauno sindromui, Patau sindromui (tryliktosios chromosomos trisomija).

Žmogaus autosomų aneuploidija. Levanas (A. Levan) ir Tžijo (J. H. Tjio) 1956 m. sukūrė metodą žmogaus chromosomoms tirti somatinių ląstelių kultūrose. Pritaikęs šį metodą, 1959 m. prancūzų genetikas Leženas (J. Lejeune) aptiko pirmuosius žmogaus aneuploidus. Jis įrodė, kad žmonės, sergantys Dauno liga, yra dvidešimt pirmosios chromosomos trisomikai. Sergantys šia liga yra psichiškai ir fiziškai atsilikę, būdinga hipotonija. Jų imunitetas susilpnėjęs, linkę sirgti leukemija. Didelis mirtingumas ir trumpas amžius. Nuostabą kėlė gana vienoda visų Dauno liga sergančiųjų



6.12 pav. **Įvairių žmogaus chromosomų anomalijų dažniai** (pagal K. Sankaranarayanan, 1979)

išvaizda, nors jie būtų visiškai ne giminės: apvalus „mėnulio" veidas, įstrižos akys, akies medialiniame kampe odos raukšlė – epikantas, didelis liežuvis, plati plokščia nosis, širdies defektai ir kt. Būdinga delno raukšlė: yra tik viena lenkiamoji raukšlė (6.13 pav.). Vyrai sterilūs. Šio sindromo dažnis, A. Sinkaus duomenimis, 1 iš 600–800 naujagimių. Tačiau pastebėta, kad aneuploidų, tarp jų ir sergančių Dauno liga, būna gerokai daugiau, kai gimdo vyresnės negu 35 metų moterys (6.1 lentelė). Ir kitų aneuploidų dažnis



6.13 pav. **Dauno sindromas:**
1 – ligonio veidas; *2* – dėmės rainelėje; delno dermatoglifika: *3* – sveiko žmogaus; *4, 5* – sergančiojo Dauno liga (pagal A. Sinkų, 1989)

priklauso nuo motinų amžiaus, todėl pagal nustatytą tvarką Lietuvoje vyresnės kaip 35 m. amžiaus nėščios moterys turėtų pasitikrinti genetikos centruose. Taip galima išvengti visų anomalijų, kurias sukelia chromosomų skaičiaus ir sandaros pokyčiai.

Dauno ligai, kaip ir daugeliui kitų žmogaus genomo mutacijų, būdingas **nevisiškas penetrantiškumas** (lot. *penetro* – įsiskverbimas) ir **ekspresyvumas** (išraiška). Pasitaiko asmenų, kurie turi tris 21-ąsias chromosomas, bet yra normalios psichikos arba Dauno ligos požymiai pasireiškia nevienodai. Aptikta asmenų, kurie stipriau ar silpniau serga Dauno liga ir turi normalų chromosomų skaičių. Ištyrus jų chromosomas, nustatytos chromosomų mutacijos 21-ojoje chromosomoje. Todėl pamatuotai kyla klausimas, kuris 21-osios chromosomos segmentas ar genas sukelia šią ligą.

Dozei jautrūs genai. Ištyrus įvairias 21-osios chromosomos mutacijas, nustatyta, kad Dauno liga sietina su 21-osios chromosomos ilgojo peties 22 segmentu 21q22. Šis segmentas vadinamas DSCR

6.1 lentelė. **Dauno liga ir motinos amžius** (remiantis F. Vogel, A.G. Motulsky, 1997)

Motinos amžius m.	Dauno ligos dažnis		
	gimus	vaisiaus tyrimai	
		amniono	choriono gaurelio
30	1/700	–	–
35	1/450	1/250	1/240
37	1/250	1/150	1/133
39	1/150	1/100	1/75
41	1/80	1/60	1/44
43	1/50	1/35	1/23
Apskritai	1/650	–	–

(angl. *Down syndrome critical region*). Jis yra apie 4 Mb ir jame nustatyta apie 20 genų (o turėtų būti apie 50–100). DSCR aptikti genai, kurie beveik visiškai nustoja veikti, kai jų dozė **triguba**.

Antai 21-osios chromosomos trisomikuose *CBS* (cistationo β-sintazės), *PFKL* (fosfofruktokinazės, veiklios eritrocituose ir fibroblastuose), *SOD1* (superoksiddismutazės 1), *INFNRA* (α interferono įsijungimo fibroblastuose) ir kai kurių kitų genų veikla trisomikuose sumažėja iki 1–2%, lyginant su normalia šių genų veikla. Paprastai diploidinio organizmo genome yra tik dvi šių genų kopijos – po vieną homologinėse chromosomose. Trisomikų yra trys 21-osios chromosomos, tad ir triguba genų dozė. Bet ne visų 21-ojoje chromosomoje esančių genų veikla slopinama trigubos jų dozės.

Žmogaus 21-oji chromosoma yra ne vienintelė, kurioje yra genų, slopinamų trigubos jų dozės. Prisiminkime X chromosomos *DSS* (*DAX1*) lokusą (žr. 5.14 pav.), kurio padvigubėjimas sukelia XY lyties reversiją. Kitų žmogaus aneuploidų fenotipo pokyčiai irgi siejami su genais, kurių veikla priklauso nuo dozės.

Verta prisiminti, kad III skyriuje nagrinėjome priešingą reiškinį: kuo daugiau geno kopijų, tuo daugiau pasigamina geno koduojamų produktų. Vadinasi, genai ir pagal dozę yra įvairūs.

Tryliktosios chromosomos trisomija (Patau sindromas). Naujagimiams būdinga smegenų, akių, širdies defektai, nesuaugusi lūpa ir gomurys, polidaktilija (daugiapirštiškumas) ir kt. Jie neilgai gyvena – apie 90 parų. Dažnis 1 iš 10000–20000 naujagimių. Įdomu, kad apie 80% vaikų su Patau sindromu gimsta birželio–lapkričio mėnesį.

Aštuonioliktosios chromosomos trisomija (Edvardso sindromas). Ligoniams atsilikusi psichomotorinė raida, mažesnė kūno masė. Naujagimiams būdingos smailios, žemiau negu normaliai ausys, odos perteklius ant kaklo, širdies ydos, pakitusi kaukolės forma ir kt. Naujagimiai irgi neišgyvena: 75–80% visų naujagimių yra mergaitės. Dažnis 1 iš 5000–10000 naujagimių.

Labai retai aptinkama 7, 8, 9 ir 22 chromosomų trisomikų, ir tai dviejų pirmųjų – tik mozaikos. Daugelis autosomų aneuploidų žūva iki gimstant.

Lytinių chromosomų aneuploidams būdingas dar silpnesnis penetrantiškumas ir labai nevienoda sindromų raiška, palyginti su autosomų aneuploidais. Todėl dalis aneuploidų, kurių fenotipas normalus, apskritai lieka neišaiškinti. „Vyriškų“ kariotipų aneuploidija dažniausiai pasireiškia kaip Klainfelterio (*Klinefelter*) sindromas.

XXY trisomija – tipiškas („klasikinis“) Klainfelterio sindromas. Pasireiškia labai įvairiai. Vyrai dažniausiai yra ištįsę ir ploni, mažomis gonadomis, neišsivysto spermatozoidai (azoospermija). Gimsta vienas iš 500–1000 berniukų.

6.14 pav. **Ternerio sindromas:** ryški kaklo raukšlė (iš A. Sinkaus, 1989)

Vyrų XYY. Tipišku atveju vyrai aukšto ūgio, pasižymi neadekvačia reakcija iškilus konfliktams, agresyvumu. Remiantis šiuo sindromu, nusikalstamumą neteisingai bandyta aiškinti ne socialinėmis, o tik biologinėmis priežastimis. Kai kuriais atvejais chromosomų analizė gali būti rimtas rodiklis sprendžiant žmogaus pakaltinamumą. Tačiau vyrų su XXY tarp nusikaltėlių yra labai nedaug. Vienas iš rodiklių nusikaltėlio kariotipui patikrinti laikomas jo aukštas ūgis. Tarp kitko, susidomėta ir sportininkais. Aukštaūgių sportininkų kariotipas buvo tiriamas, bet jo pokyčių neaptikta.

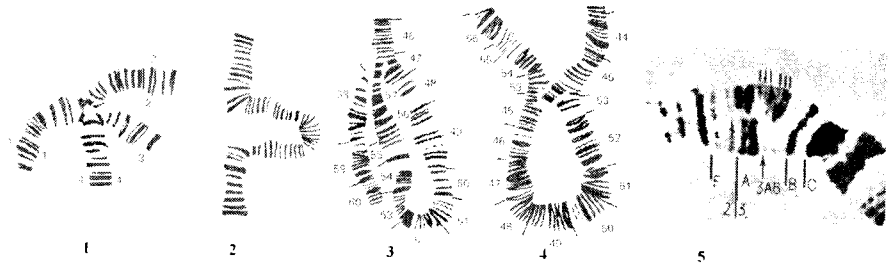
Moterų X monosomija vadinama **Ternerio** (Turner) **sindromu.** Gimsta viena iš 2500 mergaičių. Moterys būna žemo ūgio, kartais „sfinkso veido“ dėl būdingos sparninės kaklo raukšlės (6.14 pav.), nevaisingos, būdinga nenormali kiaušidžių raida ir lytinis infantilizmas ir kt. Psichika dažniausiai normali.

6.3.2. Chromosomų mutacijos

Šios mutacijos dar vadinamos **chromosomų aberacijomis**, nedarant skirtumo tarp tų pokyčių, kurie atsiranda ląstelę paveikus mutagenu ir kurių didelė dalis išnyksta dažnai jau po pirmojo ląstelių dalijimosi, ir tų sandaros pokyčių, kurie paveldimi ląstelių/organizmų kartose. Šios knygos autorius laikosi nuomonės, kad šiuos du chromosomų sandaros pokyčius, nors jie ir tos pačios kilmės, – reikia vertinti diferencijuotai.

Chromosomų mutacijos yra chromosomos sandaros pokyčiai, aptinkami genetiniais ir citogenetiniais metodais.

Chromosomų mutacijas galima stebėti šviesiniu mikroskopu. Jos yra įvairių tipų, priklausomai nuo tipo skirtingai pasireiškia genetiškai. Chromosomų mutacijoms citogenetiškai aptikti yra du bendri visiems jų tipams būdai:



6.15 pav. **Translokacija (*1*), delecija (*2*), inversijos (*3, 4*) ir judriojo genomo elemento P insercija (*5*) politeninėse drozofilos chromosomose:**
5 – įsiterpę 6 papildomi diskai 3A4–3A6 (pagal E. Altenburg, 1957, 5 – M. J. Simmons, J. K. Lim, 1980)

- nustatyti chromosomų struktūros pokyčius dažant chromosomas diferencijuotai arba spalvotai;
- tirti homologinių chromosomų konjugaciją, kai vienoje jų yra normali genų seka, antroje – chromosomų mutacija.

1996 m. surastas būdas, kaip skirtingomis spalvomis nudažyti visą žmogaus kariotipą (žr. 1.12 pav.). Kiekviena chromosoma nusidažo skirtinga spalva ir atspalviu. Tai atliekama parinkus filtrus ir dažant šešiais skirtingais fluorescuojančiais dažais. Spalvos ir atspalviai analizuojami kompiuteriu.

Antrasis būdas – klasikinis. Kaip minėta, vienoje iš homologinių chromosomų turi būti chromosomų mutacija, kitoje – normali genų seka. Tokioje padėtyje homologinės chromosomos konjuguoja neįprastu būdu, ir tai matoma šviesiniu mikroskopu. Kai kurių organizmų (drozofilos, uodo trūklio ir kt.) chromosomų mutacijas tirti lengviau todėl, kad jos turi politenines chromosomas, kurios matomos konjugavusios ir somatinėse (pvz., seilių liaukų) ląstelėse. Tokių chromosomų nereikia dažyti diferencinio dažymo būdu, nes jose matyti Balbijanio žiedai ir nustatomi net palyginti maži chromosomų sandaros pokyčiai (6.15 pav.).

Pagal pokyčių pobūdį chromosomų mutacijos skirstomos į viduchromosomines ir tarpchromosomines:

- **viduchromosominės** mutacijos yra delecijos, duplikacijos, inversijos, insercijos, viduchromosominės translokacijos;
- **tarpchromosominių** mutacijų yra vienas tipas – tarpchromosominės translokacijos.

Chromosomų mutacijos žymimos sutartiniais ženklais:

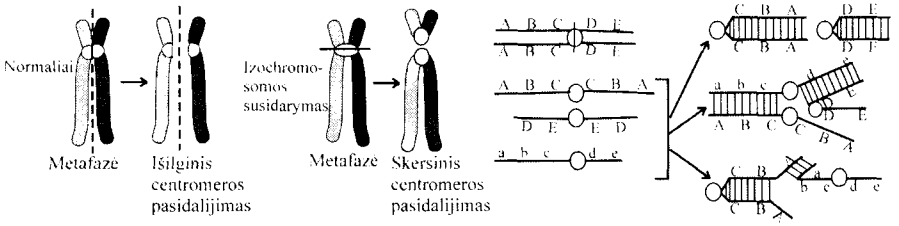
- **delecija = del**, pvz., del5p–, t. y. penktosios chromosomos trumpojo peties delecija;
- **duplikacija = dup**, pvz., dup1q+, t. y. pirmosios chromosomos ilgojo peties duplikacija;
- **inversija = inv**, pvz., inv12q11–13, t. y. dvyliktosios chromosomos ilgojo peties 11–13 segmentų inversija;
- **translokacija = t**, pvz., –5, –12,t(5p12p) – dvi tarpchromosominės translokacijos, apsikeista segmentais tarp 5-osios ir 12-osios chromosomų trumpųjų pečių;
- ir kiti.

Delecija (6.16 pav., *2*) – chromosomos dalies iškrita. Kai delecija yra chromosomos vidinėje dalyje, kad chromosomų konjugacija vyktų lokusas į lokusą, toje homologinėje chromosomoje, kuri yra normalios sandaros, susidaro kilpa: segmentas, neturintis homologo, „praleidžiamas“. Tuo tarpu chromosoma su delecija chromosomos gale yra tik trumpesnė už normalią chromosomą.

Iškritus segmentui, kuriame yra dominuojantis genas, dėl hemizigotinės būsenos fenotipe pasireiškia recesyvieji genai. Stambios delecijos, taip pat gyvybei svarbių genų delecijos yra letalios.

Delecijomis pasinaudojama norint **nustatyti genų vietą chromosomoje**. Jos gali būti **paveldimų žmogaus defektų priežastis**. Pavyzdžiui, kai žmogaus penktojoje chromosomoje iškritusi dalis trumpesniojo peties, paveldėjusių šią chromosomą naujagimių riksmas primena katės kniaukimą. Todėl ši anomalija pavadinta „katės kniaukimo“ sindromu, nors yra nemaža ir kitokių morfologinių pokyčių: „mėnulio“ veidas, mikrocefalija, pakitusi akių forma ir kt. Vėliau šis riksmas praeina, tik labai išsigandę žmonės suklykia katės balsu.

Duplikacija – chromosomų mutacija, kai chromosomoje segmentas yra padvigubėjęs. Kai pasikartojantys segmentai seka vienas paskui kitą, tokios duplikacijos vadinamos **tandeminėmis**. Jos iš dalies



6.16 pav. **Izochromosomų susidarymas (*b*) ir konjugacija (*c*):**
a – normalus chromatidžių pasiskirstymas

aptartos dėstant netolygų krosingoverį. Pavyzdžiu gali būti drozofilos mutacija *Bar*. Tai vieno lokuso padvigubėjimas arba patrigubėjimas (žr. 1.9 pav.).

Dėl duplikacijų, ypač didelių segmentų, gali sumažėti gyvybingumas. Tačiau, kaip daug kartų buvo galima įsitikinti, dėl kai kurių genų duplikacijų organizmai tampa atsparesni įvairiems aplinkos poveikiams. Taip atsirado genome **kartotiniai genai**, kurių svarba jau nagrinėta. Nuo duplikacijų prasideda ir **naujų genų evoliucija**: dėl mutacijų iš pradžių du visiškai tapatūs lokusai pradeda skirtis, pasireiškia jų divergencija.

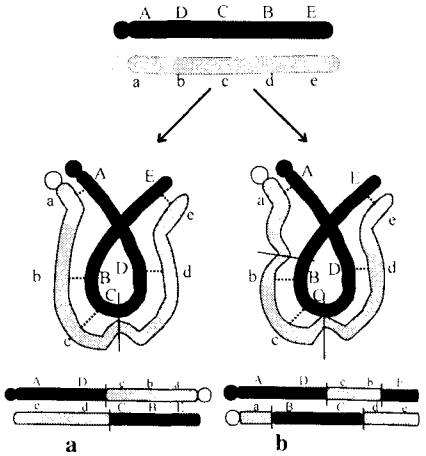
Izochromosomos (gr. *isos* – lygus), žymimos i. Kartais lygiapetės, metacentrinės chromosomos turi vienodų genetinių ypatybių ir struktūros pečius. Tiksliau, izochromosomos pečiai kaip veidrodyje atspindi vienas kitą, pvz., ***ABCDcenDCBA***. Jos atsiranda netaisyklingai pasidalijus centromerai (6.16 pav.). Mejozėje ji gali konjuguoti labai įvairiai: vienas chromosomos petys su kitu arba su atitinkamu kitos homologinės chromosomos petimi, arba iš karto abiem būdais.

Inversija (6.15 pav., *3* ir *4*) būna tada, kai chromosomos segmentas pasisuka 180°. Po inversijos genetinės medžiagos lieka tiek pat, bet pakinta genų vieta.

Konjugavus chromosomoms, kurių vienoje yra normali genų seka, o kitoje inversija, susidaro sudėtinga kilpa („mirties kilpa"). Paprasčiausios, paracentrinės translokacijos kilpa pavaizduota 6.15 paveiksle. Inversijos skirstomos į įvairius tipus pagal pokyčių pobūdį. Svarbu žinoti du inversijų tipus:

- **paracentrinė inversija**, kai pasisukantis 180° chromosomos segmentas neturi centromeros;
- **pericentrinė inversija**, kai invertuotame segmente yra centromera. Kilpa šiuo atveju sudėtingesnė.

Genetiniuose tyrimuose inversijos naudojamos norint išvengti krosingoverio. Iš tikrųjų jos krosingoverio neslopina, bet jam įvykus tarp homologinių chromosomų, kurių vienoje yra normali seka, o kitoje – inversija, susidaro genetiškai nesubalansuotos, todėl negyvybingos lytinės ląstelės (6.17 pav., *a*). Viena iš ląstelių turi chromosomą dicentriką (su dviem centromeromis). Be to, lokusas *A(a)* yra padvigubėjęs, o lokuso *E(e)* šioje chromosomoje visai nėra. Antroji chromosoma visai be centromeros, be to, lokusas



6.17 pav. **Viengubas (*a*) ir dvigubas (*b*) krosingoveris tarp homologinių chromosomų, iš kurių vienoje yra inversija**

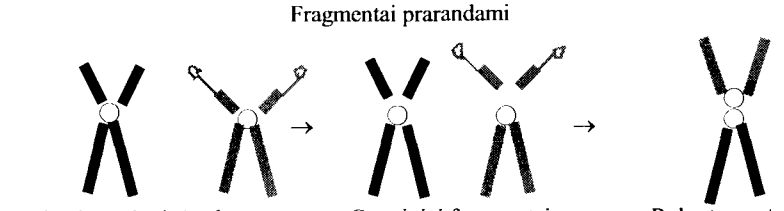
E(e) yra padvigubėjęs, o lokuso *A(a)* nėra. Abiejų tipų chromosomos sąlygoja negyvybingas lytines ląsteles. Bet kai įvyksta dvigubas krosingoveris (6.17 pav., *b*), susidaro gyvybingos lytinės ląstelės.

Insercijos, arba **intarpai**, (6.15 pav., *5*) atsiranda įvairiais būdais įsiterpus svetimai DNR. Jas, pvz., sukelia virusai, egzogeninė DNR. Mejozėje jos sudaro kilpas, panašias į delecijų. Tik šiuo atveju atvirkščiai: nehomologinį, „atliekamą" segmentą turi pakitusi chromosoma. Tarp kitko, panašios kilpos yra ir duplikacijų.

Translokacijos. Plačiąja prasme translokacijomis vadinami visi pokyčiai, kai chromosomos segmentas pakeičia vietą: iš vienos vietos patenka į kitą toje pačioje chromosomoje arba iš vienos homologinės chromosomos pereina į kitą. Visa tai yra **viduchromosominės translokacijos**. Chromosomos segmentas gali būti perkeltas ir iš vienos nehomologinės chromosomos į kitą nehomologinę chromosomą. Tai **tarpchromosominės translokacijos**. Jos skiriasi nuo viduchromosominių translokacijų genetiniu ir fenotipiniu reiškimusi. Translokacijos gali įvykti įvairiais būdais: dėl judriųjų genomo elementų, genetinės rekombinacijos, mutagenezės. Taigi pagal kilmę tai mišri grupė.

Robertsono translokacijos. Skirtingai nuo izochromosomų, gali susilieti nehomologinės chromosomos.

Robertsono translokacijos atsiranda **susiliejant** nehomologinių chromosomų **centromeroms**:



Kad Robertsono translokacija būtų gyvybinga, t. y. kad susidarytų subalansuota (nepraradusi genų) chromosoma, turi susilieti dvi akrocentrinės chromosomos per jų centromeras, panašiai kaip susidarant izochromosomai. Keitimasis chromosomų pečiais vyksta centromerinio heterochromatino (α kartotinių sekų) sankaupos vietoje.

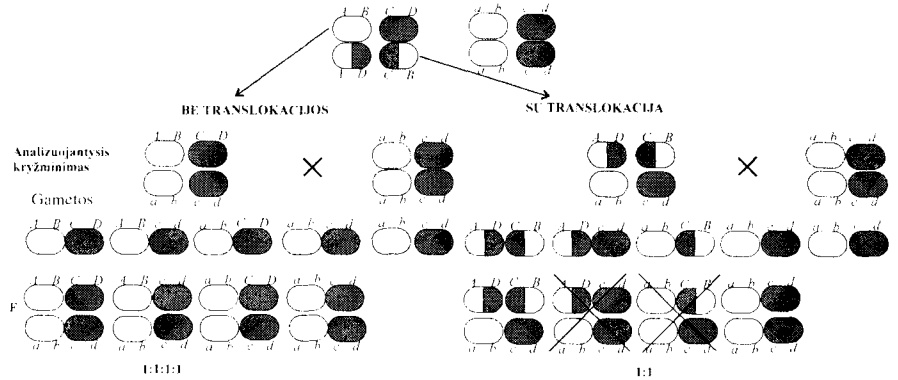
Dėl Robertsono translokacijos kariotipe sumažėja viena chromosoma. Todėl kariotipas užrašomas nurodant ir tas chromosomas, kurios susiliejo:

–45, XY, –14, –21, +t(14, 21), t. y. vyras, kurio kariotipe susiliejusios 14-oji ir 21-oji chromosomos. Tad jis turi tik 45 chromosomas, o **+t(14, 21)** – taip nurodoma Robertsono translokacija.

Tarpchromosominės translokacijos (6.15 pav., *1*). Kai keičiamasi fragmentais tarp nehomologinių chromosomų, translokacija vadinama **reciprokine**. Translokacija yra **nereciprokinė**, kai vienoje iš nehomologinių chromosomų yra translokuotas segmentas, o kitoje – delecija. Pavyzdžiui, Leženas 1963 m. aprašė vienos šeimos naujagimį su „katės kniaukimo" sindromu. Vienoje iš dviejų penktųjų vaiko motinos chromosomų buvo delecija, o vienoje iš penkioliktųjų – translokacija. Motina buvo sveika, nes **genų balansas nebuvo pažeistas**. Vaikui, kuris iš motinos paveldėjo penktąją chromosomą su delecija ir penkioliktąją normalią, o iš tėvo – abi normalias chromosomas, pasireiškė „katės kniaukimo" sindromas. Vaikai, kurie iš motinos paveldėjo tik penkioliktąją chromosomą su translokacija (penktoji chromosoma buvo normali), turėjo įvairių kitų sutrikimų.

Translokacijos gali būti aptinkamos genetiniais ir citogenetiniais metodais.

Genetiniais metodais tarpchromosominės translokacijos aptinkamos tiriant genų sankibą (6.18 pav.). Kai analizuojančiaisiais kryžminimais tiriamos chromosomos su normalia genų seka, lygiu santykiu susidaro 4 tipų gametos, taip pat palikuonys, t. y. **1:1:1:1**. Visi vienodai gyvybingi. Kai individo chromosomose heterozigotinėje būklėje yra translokacija, nors ir susidaro lygiu santykiu 4 lytinių ląstelių tipai, bet dviejų yra genetiškai nesubalansuotos chromosomos: *AD cd* ir *ab CB*. Šios ląstelės ir iš jų kilusios zigotos neišgyvena. Vadinasi, atlikus analizuojantįjį kryžminimą, vietoj 4 zigotų tipų gaunama tik 2, santykiu **1:1**.



6.18 pav. **Genetinis būdas tarpchromosominėms translokacijoms aptikti (analizuojantysis kryžminimas)**

Tarpchromosomines translokacijas galima nustatyti **citogenetiniais metodais** mejozėje ir mitozėje. Gigantinių chromosomų mitozėje susidaro labai savitas vaizdas. Mejozės I zigotenoje, kad chromosomos konjuguotų labai tiksliai, lokusas į lokusą, keturios chromosomos sudaro kryžių, kuris toliau I diplotenoje-diakinezėje, homologinėms chromosomoms išsiskiriant, virsta žiedu. Iš žiedo susidaro keturių tipų gametos: *AB BC*, *AD DC*, *DA AB*, *DC CB*, nes achromatinės verpstės siūlai prie žiedo gali prisitvirtinti dvejopai. Tačiau visos šios lytinės ląstelės yra genetiškai nesubalansuotos, todėl negyvybingos. Gyvybingos lytinės ląstelės būna tada, kai iš žiedo susidaro aštuoniukė. Mat žiedas erdviniu atžvilgiu yra nestabili figūra, jis persisuka sudarydamas aštuoniukę. Ji visuomet išsidėsto visu ilgiu pusiaujo plokštumos link, todėl iš jos susidaro tik dviejų tipų lytinės ląstelės: *AB CD* ir *AD CB*. Jos yra genetiškai subalansuotos ir gyvybingos (6.19 pav.).

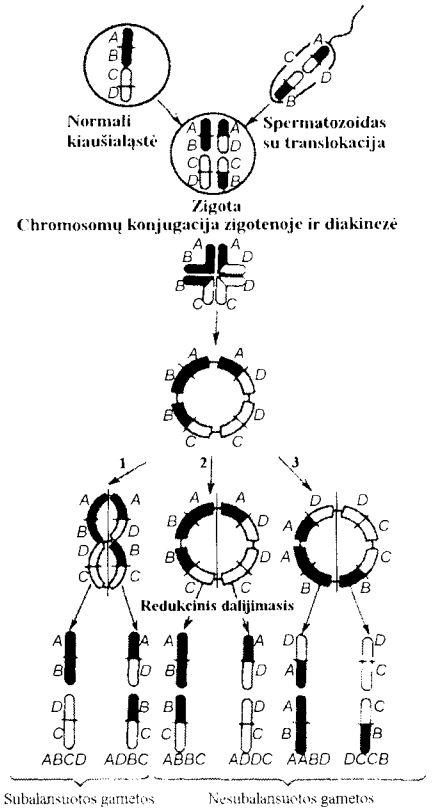
Praktinė translokacijų nauda. Tai toks chromosomų mutacijų tipas, kurio labai rūpestingai kuriamos **genetinės kolekcijos**. Mat dėl tarpchromosominių translokacijų genai atsiduria **naujose sankibos grupėse**.

Kokia šio reiškinio praktinė nauda, geriausiai pasiaiškinti konkrečiu pavyzdžiu – translokacijų taikymu **žymėti lytį**. Chromosomos segmentas iš autosomos gali būti translokuotas ne tik į kitą autosomą, bet ir į lytines X ar net Y chromosomas. Tai iš esmės keičia paveldėjimo pobūdį:

- iš autosomos į X chromosomą translokuoti genai tampa „sukibusiais“ su lytimi;
- iš autosomos į Y chromosomą translokuoti genai tampa holandriniais.

Tuo pasinaudota lyčiai žymėti. Apšvitinus šilkverpius jonizuojančiaisiais spinduliais sukeliami chromosomų trūkiai bei translokacijos. Taip pavyko geną, kuris lemia juodą kiaušinėlių spalvą, iš autosomos perkelti į Y chromosomą (drugių ji dažnai žymima W, atitinkamai X chromosoma žymima Z; XX yra patinėliai, XY – patelės). Kokia šio darbo prasmė?

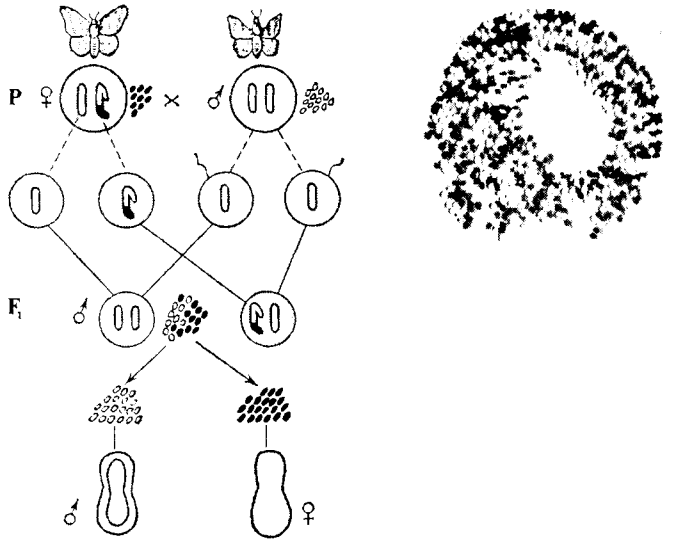
Nuvyniojant šilkverpio kokonus, iš kurių išsivystys vyriškos lyties drugys, gaunama 30% daugiau šilko, negu iš kokonų, iš kurių išsivystys moteriška lytis. Drugiai, tarp jų ir šilkverpiai, pracina **metamorfozę kiaušinėlis → lerva (vikšras) → lėliukė (kokonas) → suaugėlis drugys**. Tačiau apie drugių lytį galima spręsti tik jiems išsiritus iš lėliukės. Kaip sakoma: „Šaukštai po pietų!“



6.19 pav. **Chromosomų, heterozigotinių pagal reciprokinę translokaciją, mejozė ir lytinės ląstelės**

Pagal iš anksto numatytą planą (6.20 pav.) kryžminant pateles (XY = ZW), kurių Y chromosomoje buvo translokuotas genas, lemiantis juodą kiaušinėlių spalvą, su patinėliais (XX = ZZ), kurių kiaušinėlių spalva balta, iš baltos spalvos kiaušinėlių toliau vystėsi tik patinėliai. Sukurtas nesudėtingas prietaisas baltiems (būsimi patinėliai) ir juodiems (būsimos patelės) kiaušinėliams rūšiuoti.

Žmogaus chromosomų mutacijos. Pirmosios žmogaus chromosomų mutacijos, kurias pavyko nustatyti, buvo delecijos. Leženas su bendradarbiais 1963 m. nustatė, kad „kačių kniaukimo“ (pranc. *cri du chat*) sindromas atsiranda dėl delecijos 5-osios chromosomos trumpajame petyje **del5p-**. Šio sindromo ypatybės jau minėtos ir anksčiau. Tačiau pats sindromas gali atsirasti ir dėl kitų 5-osios chromosomos mutacijų: žiedinės chromosomos, translokacijų. Sindromas išsivysto, kai prarandami 5p14–15 segmentai.

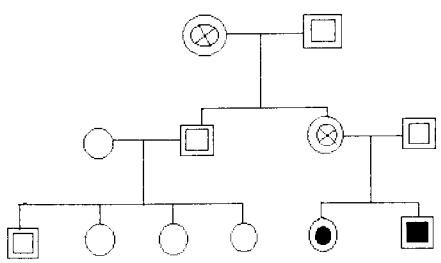


6.20 pav. **Šilkverpio kiaušinėlių spalvos (tamsėjančių) geno translokacija iš autosomos į Y chromosomą** (pagal. V. Strunikovą, 1983)

Tais pačiais 1963 m. pasirodė pirmoji publikacija apie kitą žmogaus chromosomų mutaciją – 18-osios chromosomos trumpojo peties deleciją **del18p-**. Ją aptiko de Grušy (J. de Grouchy) su bendradarbiais. Dėl šios delecijos vaikai protiškai atsilikę, del18p- sindromo požymiai panašūs į Dauno, Ternerio ir kt. sindromų. Būdingos labai didelės ausys. Įtarimas dėl šio sindromo kyla tada, kai asmuo visiškai neturi plaukų arba yra vienaakis (ciklopija), arba be nosies (arinija).

Pagal delecijas tiriama ir genų sankiba bei artimai sukibę genai.

Iš stambesnių chromosomų mutacijų dažniausiai pasitaiko Robertsono translokacijos ir reciprokinės (abipusės) subalansuotos translokacijos. Tai galima nesunkiai paaiškinti. Subalansuotos chromosomų mutacijos arba visiškai nepažeidžia fenotipo (asmenys normalūs), arba fenotipas pažeidžiamas silpniau negu esant kariotipe tik vienai iš dviejų (buvusių subalansuotų) chromosomų mutacijų:



– **Subalansuota translokacija 46,t (7p+, 10p–): translokacija į 7-ąją chr. (7p+) iš 10-osios chr.; šioje yra delecija (10p–)**

– **Palikuonys, kurie paveldėjo tik translokaciją 46,t (7p+)**

– **Asmenys, kurių kariotipas buvo tirtas**

Kartais klausiama: kodėl apskritai pakinta fenotipas, jeigu yra subalansuotos chromosomų mutacijos? Atsakymas paprastas. Pažeidžiamas mutacijos riboje esantis genas – gali būti jo mikrodelecija ir pan. Tas pat gali atsitikti ir translokuoto segmento susijungimo su chromosoma vietoje. Be to, gali pasireikšti padėties efektas. Taip, pvz., yra su filadelfine 22-ąja chromosoma. Nors tai yra reciprokinė translokacija tarp 22-osios ir 9-osios chromosomų t(9; 22) (q34; q11), vystosi mieloidinė (kaulų čiulpų) leukozė. Mat nukenčia translokacijos riboje 9-ojoje chromosomoje esantis onkogenas *c-ALB*.

Žmogaus chromosomų ir genomo mutacijų bendra ypatybė yra ta, kad jos dažniausiai yra nauji įvykiai tėvų ląstelėse. Mutacijas paveldi jų vaikai, bet dažnai šioje kartoje jos eliminuojasi.

Daugelis chromosomų ir genomo mutacijų pasišalina iki gimstant. Daug asmenų, gimusių su chromosomų ir genomo mutacijomis, miršta nepalikę palikuonių, yra nevaisingi. A. Sinkaus duomenimis, apie 16% tirtų vyrų, kuriems sperma nesigamino, turėjo pakitusį kariotipą (lytinių chromosomų anomalijas).

Chromosomų mutacijų tyrimai Lietuvoje atliekami dviejuose centruose: Vilniaus universiteto žmogaus genetikos centre (V. Kučinskas) prenatalinė diagnostika ir Kauno medicinos universitete (A. Sinkus) naujagimių ir įvairaus amžiaus asmenų chromosominės ligos/sindromai. Labiau besidomintiems žmogaus genomo ir chromosomų mutacijomis rekomenduotina A. Sinkaus „Žmogaus chromosominės ligos“ (Vilnius: Mokslas, 1989). Joje pateikiami ir tyrimų Lietuvoje rezultatai.

6.3.3. Genų mutacijos

Genų mutacijų tipai. Šios mutacijos dar vadinamos **taškinėmis**. Tai atskirų genų pokyčiai. Didelė dalis geno pokyčių atitinka chromosomų mutacijas, tik skiriasi dydžiu. Jie yra vieno geno ribose. Geno viduje geriausiai ištirti **intarpai ir iškritos**. Kaip jau minėta, po tokių pokyčių geno kodonų skaitymas pasislenka, todėl šios mutacijos vadinamos **rėmelio poslinkio mutacijomis** (angl. *frameshift*). Po tokių mutacijų genas būna neveiklus.

Pakaitos būdingos tik genų mutacijoms. Jos dviejų tipų.

1. **Tranzicijos** (lot. *transitus* – perėjimas), kai purinas pakeičiamas purinu arba pirimidinas – pirimidinu:

A⇔G arba **T⇔C**

2. **Transversijos** (lot. *trans* + *versio* – atmaina), kai pirimidinas pakeičiamas purinu arba purinas – pirimidinu:

T ⇔ A
↑↓ ↑↓
G ⇔ C

Dėl pakaitų gali būti trijų tipų genų mutacijos:

- **neutralios**, kai kodone pasikeičia 3-iasis nukleotidas ir kodonų prasmė nesikeičia, pvz., **CCA** (Pro)→**CCG** (Pro),
  ACC (Thr)→**ACA** (Thr),
  GGG (Gly)→**GGA** (Gly) ir pan.;
- ***misens* mutacijos** – klaidingos prasmės mutacijos: geno koduojamame baltyme vietoj vienos aminorūgšties būna kita – sintetinami mutantiniai baltymai;
- ***nonsens* mutacijos**, dėl kurių aminorūgštis koduojantys kodonai virsta beprasmiais kodonais. Kai geno viduje atsiranda beprasmis kodonas, baltymo sintezė nutrūksta. Prisiminkime, kad šios mutacijos vadinamos pagal tai, koks beprasmis kodonas geno viduje atsiranda:

UAG – *amber,*
UAA – *ochre,*
UGA – *opal.*

Mutacijos pagal fenotipo pokyčius grupuojamos įvairiai. Pagal įvairias fenotipo savybes skiriamos:

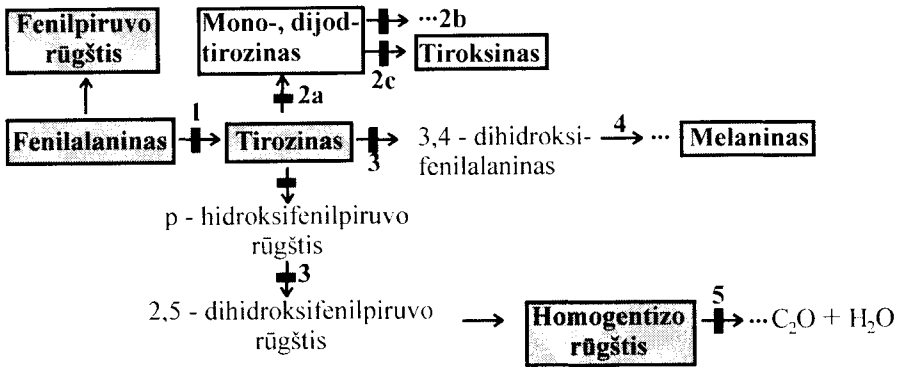
- morfologinės, fiziologinės-biologinės, biocheminės mutacijos – pagal tai, **koks požymis** pakito;
- gyvybingos, pusiau letalios ir letalios mutacijos – pagal tai, kaip atsiliepė **gyvybingumui**;

- vaisingos (fertilios), pusiau sterilios, sterilios mutacijos – pagal **vaisingumą**;
- temperatūrinės (ts) – pagal **jautrumą temperatūrai**.

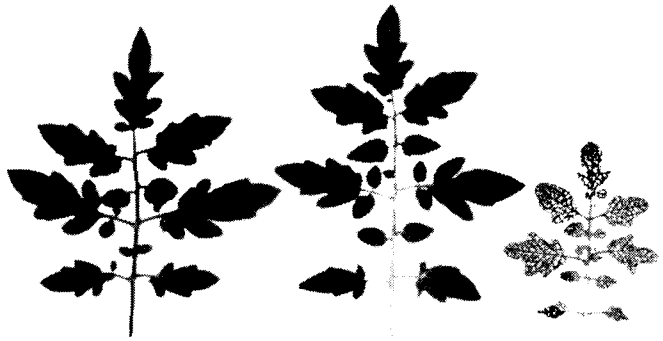
Morfologinės mutacijos – tai organų, stambesnių ar smulkesnių morfologinių požymių pokyčiai. Pvz., žmogaus skeleto pokyčiai, polidaktilija. Tarp morfologinių mutacijų į atskirą tipą skiriamos daug kartų minėtos **homeozinės mutacijos**, kai vietoj vieno organo vystosi kitas. Tai drozofilos mutacijos *Antennapedia* (vietoj antenos koja), *bithorax* (T_3 segmentas virsta T_2, todėl turi dvi poras sparnų) ir kt.

Fiziologinės mutacijos – tai paveldimi biologinių-fiziologinių požymių pokyčiai, pvz., cirkadinių ritmų, sezoninių reiškinių, augalų žydėjimo arba vegetacijos trukmės, medžiagų transporto ir kt. Pavyzdžiui, kukurūzų mutanto „tinginė" sutrikęs augalų augimo hormono heteroauksino pasiskirstymas, todėl pakitusi augalų geotropinė reakcija: jie šliaužia žemės paviršiumi. Paveldimi gyvūnų elgsenos nukrypimai irgi yra biologinės mutacijos.

Biocheminės mutacijos – tai paveldimi biocheminių reakcijų pokyčiai: tai įvairių organizmų albinosai, paveldimos žmogaus metabolizmo ligos: porfirija (kaupiasi porfirinai), fenilketonurija, tirozinozė (sutrikusi fenilalanino bei tirozino apykaita) ir kt. (6.21 pav.).



6.21 pav. **Paveldimos metabolizmo ligos, susijusios su fenilalanino apykaita žmogaus organizme:**
▒ – ligą sukelia metabolito perteklius: *1* – fenilketonurija; *3* – tirozinozė; *5* – alkaptonurija; □ – ligą sukelia metabolito stoka: *2a, 2b, 2c* – trijų tipų kretinizmas; *4* – albinizmas



6.22 pav. **Chlorofilo sintezės atsistatymas pomidorų mutanto *chloronerva* lapuose po poveikio Fe EDTA:**
kairėje – normalaus augalo (+ +), dešinėje – *chloronerva* (*chln chln*), viduryje – *chln chln* po poveikio Fe EDTA (iš H. Böhme, G. Scholz, 1960)

Visos šios trys mutacijų grupės yra labai sąlyginės. Metabolizmo ligos sukelia įvairius morfologinius pokyčius. Kai kurios mutacijos priskiriamos kitoms grupėms, nors pagal jų išaiškinimo metodą jos turėtų būti biocheminės. Pavyzdžiui, kai kurie augalų chlorofiliniai mutantai (pomidorų *chloronerva* – lapo gyslos žalios, o tarpgysliai pageltę) normalizuojasi įskiepijus juos į normalų augalą. Taip nustatomi augalų biocheminiai mutantai. Tačiau iš tikrųjų šių mutantų sutrikęs geležies įsisavinimas: jų fenotipą normalizuoja geležies druskų priedas (6.22 pav.).

Dėl kelių svarbių praktinių taikymų plačiau panagrinėsime biochemines mutacijas (žr. toliau).

Miolerio mutacijų klasifikacija. 1932 m. Mioleris pasiūlė mutacijų klasifikaciją, atsižvelgdamas į tai, kaip mutacija keitė požymį: a) slopino – **amorfinė** mutacija, b) silpnino – **hipomorfinė**, c) stiprino – **hipermorfinė**, d) keitė priešingu fenotipu – **antimorfinė** ir e) susidarė naujas fenotipas – **neomorfinė** mutacija. Šis skirstymas pirmiausia tinka genų mutacijoms. Štai keletas pavyzdžių. Augalai albinosai, kurių pigmentai visiškai nesintetinami, yra amorfinė mutacija; šviesiai žali augalai – hipomorfinė mutacija, o tamsiai žali, žalesni negu normalūs augalai, yra hipermorfinė mutacija. Kai geltona žirnių sėklaskilčių spalva tampa žalia arba atvirkščiai, yra antimorfinės mutacijos.

Gyvybingos ir letalios, vaisingos ir sterilios mutacijos. Bet kurio tipo mutacijos, ne tik genų, gali būti **gyvybingos**, **subletalios** (sin. **semiletalios** – pusiau gyvybingos) arba **letalios**. Tai priklauso ir nuo pakitusių genų lemiamų požymių svarbos organizmui, ir nuo to, kaip

stipriai dėl mutacijos sutrinka ląstelės, organizmo funkcijos ir raida. Letalios mutacijos dažnai vadinamos tiesiog **letalėmis**. Jų letalumas pasireiškia įvairiais gyvenimo momentais, net lytinėse ląstelėse, zigotose arba tik gilioje senatvėje. Letalios mutacijos yra platininė lapių spalva, žmogaus poliploidija ir siklemija, augalų albinizmas ir kt. Daugelio mutacijų tik iš dalies mažėja gyvybingumas, dalis individų išgyvena, dalis žūva. Subletali yra žmogaus mutacija, sąlygojanti odos ligą pigmentinę kserodermą (žr. 7.21 pav.).

Įvairių tipų mutacijos taip pat gali keisti organizmo vaisingumą (fertilumą). Skiriamos **vaisingos, pusiau vaisingos ir sterilios mutacijos**. Sterilumą sąlygoja, pvz., lytinių ląstelių raidą valdančių genų mutacijos.

Genų mutacijų dažnis. Jį nustatyti kur kas sudėtingiau. Genomo ir chromosomų mutacijas galima patikrinti citologiniais metodais. Deja, genų mutacijoms to padaryti negalima.

Be to, mutantinio geno dažnis priklauso nuo daugelio veiksnių, kurie gali iškreipti tyrimų rezultatus:

- **dažnai tą patį fenotipą lemia skirtingų, nealelinių genų mutacijos**, pvz., epilepsiją, porfiriją, raumenų distrofiją, hemofiliją, daltonizmą ir daugelį kitų žmogaus paveldimų ligų;
- **mutantiniai genai yra nevienodai gyvybingi ir naudingi organizmui, dažniausiai genų mutacijos yra žalingos** – jas šalina **atranka**;
- **dominuojanti, arba recesyvioji mutacija** (alelinių genų sąveika) – ši pakitusio geno savybė **tiesiogiai susijusi su atranka**. Recesyviosios mutacijos gali būti paveldimos nepasireikšdamos, o dominuojančią mutaciją iš karto įvertina atranka, ir žalingi mutantiniai genai pašalinami;
- **nealelinių genų poveikis (sąveika), genotipinė aplinka** – genai modifikatoriai net letalų geną gali paversti gyvybingu arba dominuojantį geną – recesyviuoju, „nematomu“;
- **geno penetrantiškumas** (iš dalies ir **ekspresyvumas**) – dėl nevisiško penetrantiškumo normalaus fenotipo mutacijos gali likti nepastebėtos. Tokius mutantus galima aptikti molekulinės genetikos metodais;
- **fenokopijos** – modifikacijos, nepaveldimi organizmo pokyčiai, kurie pagal fenotipą panašūs, imituoja mutacijas. Iškyla problema, kaip atskirti mutacijas nuo modifikacijų;
- **ekologiniai veiksniai, išorinė aplinka** sudaro sąlygas mutavusiam genui išlikti arba išnykti. Įvairiose geografinėse vietovėse mutacijų dažnis gali labai skirtis (6.2 lentelė).

Be to, kyla papildoma problema, kaip atskirti **naujas mutacijas nuo pakitusio mutantinio geno paplitimo dėl izoliacijos ir geno dreifo**. Jei kurioje nors vietovėje dažnas mutantinis genas, tai dar nereiškia, kad ten dažnos šio geno mutacijos. Pvz., amaurozinės idiotijos genas Švedijoje ar porfirijos genas Pietų Afrikos Respublikoje.

Būtina skirti du reiškinius: mutantinio geno dažnį populiacijoje ir šio geno naujų mutacijų atsiradimo dažnį.

Šie du reiškiniai kartais painiojami. Be to, kartais neteisingai vartojama sąvoka „naujos mutacijos“, ypač žmogaus genetikoje. Reikia skirti, kurios mutacijos iš tiesų atsiradusios naujai ir kurios naujai nustatytos, nes mutaciją lemiantis genas iki tol nepasireiškė fenotipiškai. Tai skirtingi dalykai.

Nuo kitų organizmo genų, genotipinės aplinkos priklauso genų dažnis ne tik gamtinėse populiacijose, bet ir genetinėse linijose. Pvz., kukurūzų geno r^r mutacijų dažnis Kornelio linijoje yra 1820 mutantinių ląstelių milijonui gametų, o Kolumbijos linijoje gerokai mažesnis – tik 620 mutantinių ląstelių 1 milijonui gametų.

Mutacijų dažnis yra individuali geno savybė. Ją lemia geno sandaros ypatumai (judriųjų genomo elementų įsiterpimo vietų skaičius gene, paprastųjų kartotinių sekų sankaupa gene ir kt.).

Kiekvieno organizmo genome galima aptikti genų, kurių mutacijos labai dažnos (pvz., žmogaus – Diušeno raumenų distrofijos, kukurūzų – antociano sintezės, drozofilos – *cut* mutacija) ir yra genų, kurių mutacijos itin retos (pvz., kukurūzų – vaškinio endospermo) (6.2 ir 6.3 lentelės).

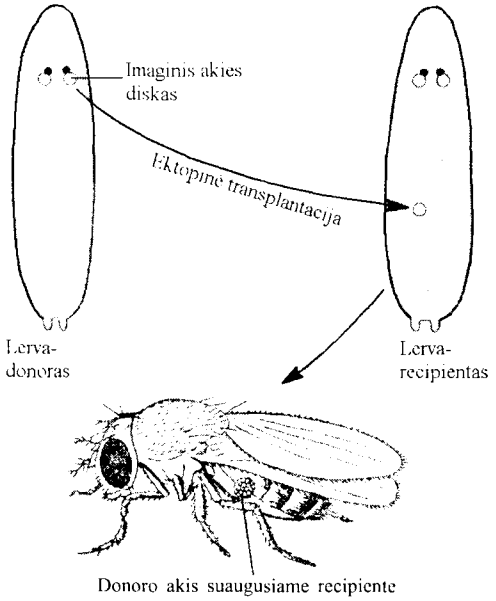
Praktinė genų mutacijų reikšmė – tai visa genetika, pradedant geno sandara ir baigiant praktiniu genų mutacijų panaudojimu naujoms augalų ir gyvulių veislėms, mikroorganizmų kamienams sukurti.

6.2 lentelė. **Kai kurių žmogaus genų mutavimo dažniai skirtingose populiacijose** (remiantis F. Vogel, A. G. Motulsky, 1997)

Liga	Populiacija, jos kilmės vieta	Mutacijų dažnis	Geno vieta
Achondroplazija (chondrodistrofija, žemas ūgis)	Danija Vokietija (Miunsteris)	1×10^{-5} $6–9\times10^{-6}$	4q
Miotoninė distrofija (sutrikusi raumenų raida)	Šiaurės Airija Šveicarija	8×10^{-6} $1,1\times10^{-5}$	19q
Retinoblastoma (tinklainės navikas)	Anglija, JAV (Mičiganas), Šveicarija, Vokietija Olandija Naujoji Zelandija	$6–7\times10^{-6}$ $1,23\times10^{-5}$ $9,3–10,9\times10^{-6}$	13q14.1–14.2
Tuberozinė sklerozė	Anglija (Oksfordas) Kinija	$1,05\times10^{-5}$ 6×10^{-6}	9q34; 11q23
Neurofibromatozė (nervinio audinio augliai)	JAV (Mičiganas) Rusija (Maskva)	1×10^{-4} $4,4–4,9\times10^{-5}$	17q11.2
Diušeno raumenų distrofija	JAV (Juta) Anglija (Nortumberlendas ir Derchemas)	$9,5\times10^{-5}$ $4,3\times10^{-5}$	Xp21.2

6.3 lentelė. **Kai kurių kukurūzų, drozofilos ir *Escherichia coli* genų gamtinio mutavimo dažniai**

Genas ir požymis	Mutacijų dažnis
Kukurūzai:	
r^r – antociano sintezė	$1{,}82\times10^{-3}$
pr – raudonas aleuronas	$1{,}1\times10^{-5}$
su – cukrinis endospermas	$2{,}4\times10^{-6}$
sh – susiraukšlėjęs endospermas	$1{,}2\times10^{-6}$
wx – vaškinis endospermas	$<1{,}5\times10^{-7}$
Drozofila:	
ct – cut – sparnai su iškirpte	$1{,}5\times10^{-4}$
v – vermilion – šviesiai raudonos akys	3×10^{-5}
f – forked – susisukę šereliai	3×10^{-5}
y – yellow – geltonas kūnas	1×10^{-4}
w – white – baltos akys	4×10^{-5}
Escherichia coli:	
$str^s \rightarrow str^r$ – atsparumas streptomicinui	4×10^{-10}
$str^r \rightarrow str^s$ – jautrumas streptomicinui	1×10^{-9}
$his^+ \rightarrow his^-$ – histidino (his) poreikis	2×10^{-7}
$his^- \rightarrow his^+$ – grįžtamoji mutacija – gebėjimas sintetinti his	2×10^{-8}
ton^r – jautrumas fagui T1	2×10^{-8}
ton^+ – atsparumas fagui T1	3×10^{-9}



6.23 pav. **Ektopinė drozofilos imaginio disko transplantacija**

6.4 lentelė. **Rudo pigmento sintezė persodintose drozofilos akyse** (remiantis G. W. Beadle, B. Efrussi, 1937)

Donoro genotipas	Recipiento genotipas	Pigmento sintezė persodintoje akyje
++	++	+
v v	++	+
cn cn	++	+
++	***v v*** arba ***cn cn***	+
cn cn	***v v***	–
v v	***cn cn***	+
cn cn	***cn cn***	–
v v	***v v***	–
cn cn arba ***v v***	***st st*** arba ***cd cd***	+
st st arba ***cd cd***	***v v*** arba ***cn cn***	–

Biocheminių mutantų svarba. Bidlis ir Teitumas biocheminiams procesams tirti pirmieji pasiūlė panaudoti biocheminius mutantus. Tokia mintis kilo ištyrus keletą drozofilos mutantų, nulemiančių šviesiai raudoną akių spalvą. Šių mutantų yra blokuota rudo pigmento sintezė. Drozofilos organai vykstant metamorfozei išsivysto iš imaginių diskų. Bidlis ir Efrusis (B. Efrussi) persodino kai kurių drozofilos mutantų, kurių subrendę individai turi vienodos spalvos šviesiai raudonas akis, t. y. *vermilion (v), cinnabar (cn), scarlet* (st) ir *cardinal (cd)*, imaginius akių diskus normalaus tipo lervoms arba vieno mutanto kitam. Be to, imaginiai akių diskai buvo persodinami į neįprastą lervos kūno dalį – hemocelį (6.23 pav.). Nepaisant to, imaginiai akių diskai diferencijuodavosi, ir subrendusio vabzdžio-recipiento pilvelyje išsivystydavo akis, kurioje būdavo galima ištirti pigmento kiekį.

Kai kuriais atvejais net persodinus vieno mutanto imaginius akių diskus kitam buvo sintetinamas rudas pigmentas (6.4 lentelė). Taip atsitiko persodinus mutanto *v v* imaginius akių diskus *cn cn* genotipo recipientams. Persodinus *v v* arba *cn cn* mutantų imaginius diskus normalioms (+ +) drozofilų lervoms, taip pat išsivystydavo normalios spalvos akys. Padaryta teisinga išvada, kad rudo pigmento sintezė vyksta keliais etapais, ir mutanto *cn cn* ląstelėse ji yra toliau pasislinkusi negu mutanto *v v*, todėl, perkėlus imaginius akių diskus iš mutanto *v v* į mutantą *cn cn*, *v v* ląstelės gauna trūkstamos medžiagos, kuri jau yra sintetinama mutanto *cn cn* ląstelėse.

Biocheminių reakcijų eiga tiriama taip:

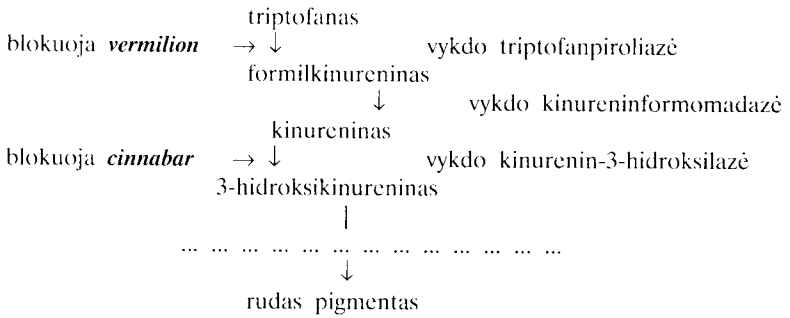
- išskiriama daug savarankiškų mutantų;

- jie ištiriami komplementacijos testu: juo nustatoma, keli genai lemia medžiagos sintezę, ir atitinkamai sugrupuojami turimi mutantai;
- iš anksto numatomos galimos tarpinės reakcijos: joms patikrinti mutantai paveikiami galimais tarpiniais sintezės produktais.

Prisiminkime, kaip buvo nustatyta drozofilos akių rudo pigmento biosintezė (žr. I sk.).

Drozofilos mutantai ***v v*** ir ***cn cn*** nesintetina rudo pigmento, todėl jų akys vienodai šviesiai raudonos, nors abu mutantai yra nealeliniai. Kuo jie tada skiriasi, gal tarpinių produktų sinteze? O kas būtų, jeigu mutantui duotume spėjamų tarpinių rudo pigmento sintezės produktų?

Mintis buvo teisinga, pavyko normalizuoti ***v v*** ir ***cn cn*** mutantų fenotipus, tik skirtingomis medžiagomis. Pavyzdžiui, drozofilos mutanto ***v v*** akių spalvą normalizuoja formilkinureninas, kinureninas, 3-hidroksikinureninas, o mutanto ***cn cn*** – tik viena iš šių medžiagų, t. y. 3-hidroksikinureninas, todėl reakcijų eiga šioje rudojo pigmento sintezės dalyje tokia:



Taip buvo atrastas būdas, kaip **normalizuoti biocheminių mutantų fenotipą:** reikia juos paveikti ta medžiaga, kurios sintezę blokuoja mutacija. Šiuo būdu pasinaudota gydant žmogaus paveldimas metabolizmo ligas: reikia duoti tos medžiagos, kurios sintezė blokuota mutacijos.

Paveldimų žmogaus metabolizmo ligų yra keli šimtai, ir vis atrandamos naujos ligos.

Pirmąsias paveldimas žmogaus metabolizmo (medžiagų apykaitos) ligas atrado dar 1899–1902 m. anglas Garodas (A. E. Garrod). Jis išaiškino, kaip paveldima alkaptonurija. Organizme kaupiasi alkaptonas (homogentizo rūgštis). Dėl to žmonių šlapimas būna rudos

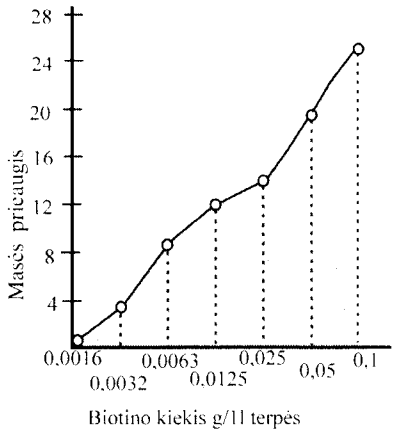
spalvos ir labai greitai tamsėja oksiduojantis ore homogentizo rūgščiai. Tokių žmonių patamsėja ir kaulai bei kremzlės, jie linkę sirgti artritu. Alkaptonas yra aminorūgščių fenilalanino ir tirozino skilimo produktas (žr. 6.21 pav.).

Fenilalanino metabolizmo mutacijos gali būti net kelių paveldimų metabolizmo ligų priežastis:

- fenilketonurijos (neperdirbamas fenilalaninas);
- tirozinozės (blokuojamas tirozino metabolizmas);
- albinizmo (iš fenilalanino-tirozino skilimo produktų nesigamina pigmentas melaninas);
- trijų tipų kretinizmo (blokuojamas jodo prijungimas prie tirozino ir kt.).

Ištyrus biocheminį mutantą, galima sėkmingai normalizuoti fenotipą, t. y. gydyti ligą. Tokiu atveju ligoniui duodama trūkstamos medžiagos (pvz., hormono) arba neleidžiama atitinkamai medžiagai (pvz., fenilalaninui) kauptis organizme.

Be to, biocheminės genetikos tyrimai svarbūs paveldimų metabolizmo ligų diagnostikai. Dėl fenilketonurijos ir galaktozemijos pasireiškia silpnaprotystė, ir tik ištyrus šių ligų prigimtį, paaiškėja, kad pirmuoju atveju neperdirbamas fenilalaninas, antruoju – laktozė.



6.24 pav. **Kalibruojančioji kreivė biotino kiekiui nustatyti:** *Debaromyces matruchoti* mutantas; užtamsintos leistinos koncentracijos; jeigu koncentracija didesnė, tiriamasis tirpalas praskiedžiamas

Biocheminiai mutantai naudojami ir kaip **savotiški reagentai nustatyti kiekiui įvairių medžiagų, ypač tų, kurių organizme mažai** (pvz., vitaminų, hormonų ir kt.). Biotino (vitamino H) kiekis nustatomas naudojant indukuotus arba gamtinius mutantus, kurie nesintetina šio vitamino. Taip aptinkami labai maži biotino kiekiai – 0,00003–0,00007 μg/1ml terpės. Sudaroma kalibruojančioji kreivė: mutantui į mitybinę terpę įdedamas įvairus biotino kiekis. Esant tinkamai koncentracijai, mikroorganizmo masės prieaugis yra tiesiog proporcingas pridedamos medžiagos kiekiui (6.24 pav.).

Tiriamosios medžiagos kiekis kokiame nors biologiniame skystyje (ekstrakte)

nustatomas įdedant jo į mitybinę terpę. Gaunamas mutanto masės prieaugis. Iš kalibruojančios kreivės sužinoma, kokį tiriamojo junginio kiekį atitinka šis masės prieaugis. Duomenų tikslumas labai priklauso nuo ekstrakto grynumo, nes mutanto masės prieaugiui turi įtakos ir kitos medžiagos, esančios ekstrakte.

Kalibruojančiosios kreivės gali būti sudarytos ir pagal kitus rodiklius, ne vien pagal masės prieaugį. Pavyzdžiui, giberelinų kiekis nustatomas žemaūgiuose žirnių mutantuose ir apie hormonų kiekį sprendžiama iš augalų ūgio: kuo daugiau hormono, tuo augalų ūgis normalesnis.

Šiais metodais medžiagos kiekis dažniausiai nustatomas netiksliai, bet greitai, todėl jie naudojami kaip **ekspresmetodai**, pavyzdžiui, kai tiriamos žmonių populiacijose aminorūgščių apykaitos ligos.

Įvairių reakcijų blokai organizme gali būti panaudoti kurti mikroorganizmų kamienus. Kai kurie *Micrococcus glutamicus* kamienai sukaupia daugiau kaip 30 mg/ml glutamo rūgšties. Gauti šios bakterijos kamienai, kurie sukaupia daugiau kaip 20–25 mg/ml lizino, t. y. 500 kartų daugiau negu pradiniai natūralūs kamienai. Tai gauta blokuojant kitų aminorūgščių sintezę iš bendro lizino pirmtako. Vadinasi, juose kaupiasi laisvasis lizinas. Kai kurių kukurūzų ir miežių mutantų grūduose yra labai padidėjęs lizino, triptofano kiekis baltymuose. Taip pavyko pagerinti baltymų maistinę vertę – padidinti nepakeičiamųjų aminorūgščių kiekį.

Mutantus – metabolitų producentus galima išskirti ir naudojant antimetabolitus (metabolitų antogonistus) arba biocheminių reakcijų inhibitorius. Kuo daugiau organizme sintetinama metabolito, tuo daugiau reikia antimetabolito arba inhibitoriaus atitinkamai reakcijai slopinti. Pramonėje mikroorganizmai gali būti naudojami kaip tarpinė grandis brangiai kainuojančioms ir technologiškai sunkioms reakcijoms atlikti. Šiam tikslui ieškoma biocheminių mutantų, kuriuose šios reakcijos intensyvesnės.

VII. MUTAGENEZĖ. GENOTOKSIKOLOGIJA

7.1. Mutagenai ir teratogenai. Bendra samprata

Kad ir kaip keista, bet Černobylio AE avarija turėjo ir teigiamą reikšmę genetiniam išprusimui. Ji parodė, kad visuomenės žinios apie genotoksikologiją yra labai menkos, net pasigailėtinos. Koks tokios avarijos pavojus, ką reikėtų veikti, turėtų žinoti kiekvienas.

Genotoksinai – tai veiksniai, kurie sąveikauja su genetinėmis struktūromis, sukeldami jų pokyčius.

Šioje knygoje pateikiama platesnė genotoksikologijos samprata: prie genotoksinių veiksnių priskiriame ir tuos, kurie sukelia įgimtus, bet nepaveldimus organizmo pokyčius – **morfozes**. Galima ginčytis, kas svarbiau, ar mutacijos, kurių dažnis net po poveikio stipriais mutagenais nėra didelis (nors tai sudėtingas klausimas, žr. toliau), ar morfozės, kurių dažnis gali būti beveik 100%.

Veiksniai, sukeliantys mutacijas, vadinami **mutagenais**. Jie yra trijų tipų:

- fiziniai,
- cheminiai,
- biologiniai.

Veiksniai, sukeliantys įgimtus naujagimių nenormalumus – teratologinius reiškinius, vadinami **teratogenais.** Teratologiniai reiškiniai yra įvairios prigimties – morfozės arba mutacijos.

Dažnai tas pats aplinkos ar vidinis veiksnys sukelia įvairių tipų pokyčius:

- mutacijas (įvairių tipų),
- rekombinacijas,
- morfozes.

Tokio veiksnio pavyzdys gali būti jonizuojančioji spinduliuotė. Antai stipriausi mutagenai jonizuojančioji spinduliuotė ir alkilinančiosios medžiagos sukelia pupų daigų lapų morfozes – specifinį margumą ir lapo formos pokyčius (7.1 pav.), kurių dažnis beveik 100%-nis. To-

7.1 pav. **Pupų morfozės (margi lapai):**
sukelia jonizuojančioji spinduliuotė, alkilinančiosios medžiagos, EDTA, sėklų senėjimas ir kt.

kius pačius pokyčius sukelia ir EDTA, kai kurie kiti junginiai, kurie suriša dvivalenčių ir trivalenčių metalų jonus ir yra stiprūs rekombinogenai, kaip ir jonizuojančioji spinduliuotė.

Rekombinogenai – tai veiksniai, sukeliantys genetinę rekombinaciją.

EDTA, tarp kitko, nėra toksiškas junginys. Jį galima naudoti mokyklose pademonstruoti, kaip atsiranda morfozės (jis vadinamas įvairiai: trilonas B, kompleksonas III).

Mutagenai ir vėžys. Daug mutagenų yra ir kancerogenai – veiksniai, sukeliantys vėžį. Susipažinus su vėžio priežastimis, tai visiškai suprantamas dalykas. Daugeliu atvejų pirminė vėžio priežastis yra mutacijos somatinėse ląstelėse. 1902 m., praslinkus tik 7 metams po to, kai Rentgenas (V. K. Röntgen) atrado X spindulius, kurie jo garbei buvo pavadinti rentgeno spinduliais, buvo įrodyta, kad šie spinduliai sukelia vėžį. Kancerogeninės mutagenų savybės labai skatina mutagenų tyrimus. Dėl šios priežasties tiems tyrimams skiriama daug dėmesio ir lėšų.

Aplinkos mutagenai, esantys organizmo aplinkoje, dėl specifinių saugos būdų ir strateginiais sumetimais genotoksikologijoje išskiriami

į atskirą aplinkos mutagenų grupę. Jie yra įvairios prigimties: fiziniai, cheminiai ir netgi biologiniai, pvz., virusinės infekcijos.

Mutacijų atsiradimas vadinamas **mutageneze**. Skiriami du mutagenezės tipai:

- **gamtinė**, arba **spontaninė** (lot. *spontaneus* – savaiminis), be aktyvaus, sąmoningo žmogaus įsikišimo,
- **indukuota**, t. y. specialiai sukelta žmogaus.

Spontaninę (gamtinę) mutagenezę dažnai sukelia tie patys veiksniai, kuriuos žmogus specialiai naudoja mutacijoms dirbtinai sukelti. Jonizuojantys ir ultravioletiniai spinduliai, net alkilinančiosios medžiagos yra aplinkos veiksniai, nors ir atrasti ieškant veiksmingų priemonių mutacijoms sukelti. Tai buvo svarbu selekcijai.

Dirbtinė mutacijų indukcija. Dirbtinės mutacijų indukcijos būdai labai įvairūs. Radioaktyvūs elementai, cheminiai mutagenai gali būti injekuojami į organizmą ir kt. Organizmus galima paveikti lakiais cheminiais mutagenais, ypač alkilinančiosiomis medžiagomis, mutageną išgarinant dujinėje aplinkoje.

Paveiktų mutagenais organizmų kartas sutarta žymėti specialiu simboliu **M** su atitinkamu indeksu, reiškiančiu kartą, $\mathbf{M}_1$, $\mathbf{M}_2$, $\mathbf{M}_3$ ir t. t. Kolchicinu paveiktų augalų kartos žymimos raide **C** irgi su atitinkamu indeksu $\mathbf{C}_1$, $\mathbf{C}_2$, $\mathbf{C}_3$ ir t. t.

Dominuojančios mutacijos pasireiškia jau $\mathbf{M}_1$, o recesyviosios tik $\mathbf{M}_2$–$\mathbf{M}_3$ ir vėlesnėse kartose.

7.2. Fiziniai mutagenai

7.2.1. Mutageninis jonizuojančiosios spinduliuotės poveikis. Priklausomybė nuo dozės

Jonizuojančioji spinduliuotė buvo pirmasis aplinkos veiksnys, kurio mutageniškumas buvo įrodytas. 1927 m. amerikiečių mokslininkas Mioleris (H. J. Muller, Morgano bendradarbis) įrodė, kad **jonizuojančioji spinduliuotė** sukelia naujas drozofilos mutacijas. Jis sukūrė specialų, labai įtikinantį metodą naujoms, „sukibusioms“ su lytimi letalioms recesyvinėms mutacijoms aptikti. Šis metodas pagal specialiai sukonstruotą drozofilos liniją vadinamas **ClB metodu** (žr. toliau).

Jonizuojančiųjų spindulių rūšys. Skiriamos dvi jonizuojančiosios spinduliuotės rūšys: elektromagnetinė spinduliuotė – rentgeno, arba X spinduliai, kurių bangos

ilgis 10^{-14}–10^{-7}m, γ spinduliai, kurių bangos ilgis mažiau kaip $4 \cdot 10^{-10}$ m; korpuskulinė spinduliuotė – srautas įvairių dalelių, kurių masę sudaro β dalelės (elektronai ir pozitronai), mezonai, protonai, α dalelės (helio atomo branduoliai, sudaryti iš 2 protonų ir 2 neutronų), neutronai (lėtieji – mažesnės energijos ir greitieji – didesnės).

Neutronams sąveikaujant su medžiaga susidaro stipriai jonizuojantys protonai – antrinis švytėjimas. Apšvitinę neutronais žmonės patys tampa pavojingi; taip atsitiko kai kuriems asmenims Černobylio AE.

Mutacijas sukelia visų rūšių jonizuojančioji spinduliuotė, bet kad būtų patogiau mutacijoms indukuoti dažniausiai naudojami rentgeno ir γ spinduliai, rečiau neutronai, α ir β dalelės, kuriomis apšvitinama įšvirkštus ir kitais būdais patekus į organizmą radioaktyviesiems izotopams.

Dozės vienetai. Visų rūšių jonizuojančiųjų spindulių dozė gali būti išreikšta sugertos (absorbuotos) jonizuojančiosios spinduliuotės energijos kiekiu masės vienetui.

Pagrindinis vienetas yra grėjus.

1 grėjus (Gy) = 1 kg masės sugeria 1 J (džaulį) energijos.

Anksčiau naudota kita vienetų sistema:

1Gy = 1000 mGy = 100 rad.

Rentgenais (R) buvo išreiškiama ekspozicinė dozė: 1 rentgenas yra tokia ekspozicinė elektromagnetinių spindulių dozė, kuri $1 cm^3$ oro (esant 0°C ir 760 mm Hg slėgiui) sukuria $2{,}083 \cdot 10^9$ abiejų ženklų jonų porų. $1R = 2{,}57976 \cdot 10^{-4}$ C (kulono)/kg.

Įvairių spinduliuotės rūšių palyginimui nustatoma **ekvivalentinė dozė**. Jos vienetas yra **zyvertas** (Sv). Jis lygus nesisteminiais vienetais:

1 Sv = 100 rem (remų), arba ber (berų).

Ekvivalentine doze dažnai įvertinamas spinduliuotės pavojus. Kad Černobylio zona būtų kuo mažesnė ir nereikėtų evakuoti daug žmonių, iš piršto buvo išlaužta 30 berų riba, todėl nukentėjo daug žmonių Gomelio, Briansko srityse.

Spinduliuotės galia išreiškiama atitinkamais vienetais per laiko vienetą, pvz., Gy/s, Gy/min, Sv/h. Ekspozicinės dozės galia – amperais/kg.

Jonizuojančiosios spinduliuotės biologiniai efektai labai įvairūs: sukelia

- spindulinę ligą,
- morfozes (minėtasis pupų lapų margumas),
- genų mutacijas,
- chromosomų degradaciją ir aberacijas,
- poliploidiją,
- rekombinaciją (netgi tose ląstelėse arba individuose, kuriuose ši paprastai nevyksta, pvz., drozofilos vyriškojoje lytyje),
- vėžį ir mirtį.

Kancerogeninis veikimas. Kokia jonizuojančiųjų spindulių dozė yra slenkstinė vėžiui sukelti, diskutuotinas klausimas. Manoma, kad ji turi būti didesnė kaip 10 Gy. Tokių dozių dažniausiai gauna asmenys, gydomi nuo vėžio, – vystosi **antrinis vėžys**.

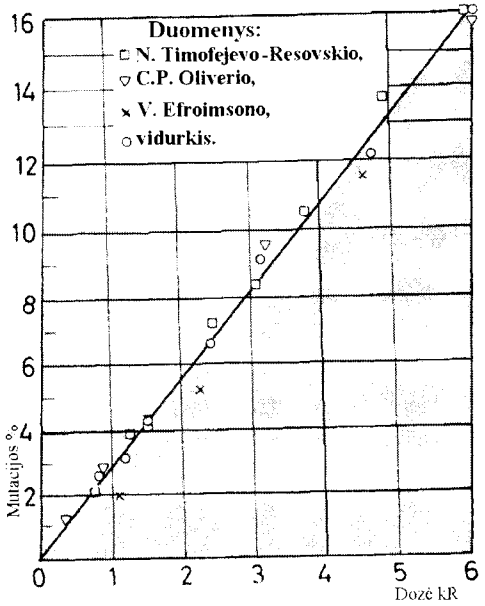
Vėžys vystosi vykstant mutacijoms, kurios atsiranda apšvitinto asmens somatinėse ląstelėse, dažniausiai dėl onkogenų ir antionkogenų mutacijų šiose ląstelėse. Žinotina, kad vėžys prasideda ne iš karto, o po 7–10 metų nuo apšvitinimo. Antai Japonijoje leukozių dažnis didėjo po atominių bombų sprogimo nuo 10,7/1 mln. 1946 m. iki 28/1 mln. gyventojų 1960 m.

Letali dozė yra vienas iš svarbių jonizuojančiosios spinduliuotės (kaip ir kitų mutagenų) parametrų. Ji žymima LD. Prie LD gali būti skaičiai, reiškiantys letalumo procentą, pvz., daug tyrimų atliekama, kai LD_{50}, t. y. kai žūva 50% apšvitintų individų. LD padeda sulyginti biologinę dozę, ypač kai tame pačiame bandyme tiriami įvairūs organizmai, genetinės linijos ir pan. Letali dozė (LD) labai įvairi skirtingiems organizmams. Paprastesnės sandaros organizmai jonizuojančiajai spinduliuotei daug atsparesni negu sudėtingos sandaros. Jautriausi yra žinduoliai. Be to, įvairių grupių organizmai skiriasi vieni nuo kitų **radiojautrumu**. Pavyzdžiui, vairenis (*Arabidopsis thaliana*) yra dešimteriopai atsparesnis spinduliuotei negu varpiniai augalai ir beveik šimteriopai atsparesnis už kai kuriuos ankštinius augalus.

Palyginkime kai kurių organizmų LD_{50} grėjais (Gy):

žmogus	– 2,5–3,5;	žuvys	– 8,0–20,0;
pelės (įvairių linijų)	– 6,0–15,0;	gyvatės	– 80,0–200,0;
žiurkės (įvairių linijų)	– 7,0–9,0;	vabzdžiai	– 10,0–100,0;
paukščiai	– 8,0–20,0;	augalai	– 10,0–1500,0!!

Ir to paties organizmo įvairios ląstelės ar net jos dalys nevienodai jautrios jonizuojančiajai spinduliuotei. Jautriausias ląstelės branduolys. Pvz., apšvitinus šilkverpius apie



7.2 pav. **Drozofilos recesyviųjų „sukibusių" su lytimi mutacijų dažnio priklausomumas nuo jonizuojančiosios spinduliuotės dozės** (pagal N. Timofejevą-Resovskį ir kt., 1966)

5500 Gy (550 kR) doze, branduolys visiškai suiro, o citoplazma išliko gyvybinga. Vabzdžio *Habrobracon* branduolį inaktyvina vos kelių dešimtųjų R dozė. Tiesa, jo citoplazma yra jautresnė negu šilkaverpio – ją inaktyvina 15 kR dozė.

Mažos jonizuojančiosios spinduliuotės dozės organizmą stimuliuoja. Toks reiškinys vadinamas **radiostimuliacija**.

Ilgesnį laiką švitinant jonizuojančiaisiais spinduliais, padidėja organizmų radioatsparumas. Šis reiškinys vadinamas **radioadaptacija**. Kai organizmai pakartotinai švitinami daugelyje kartų, gali atsirasti paveldimas atsparumas radiacijai. Mat ilgainiui letalios jonizuojančiosios spinduliuotės dozės atrenka atsparius mutantus.

Mutageninis efektas ir jonizuojančiosios spinduliuotės dozės. N. Timofejevas-Resovskis, V. Efroimsonas, Oliveris (C. P. Oliver), vėliau daugelis kitų tyrinėtojų nustatė, kad mutageninis jonizuojančiosios spinduliuotės poveikis tiesiog proporcingas jų dozei (7.2 pav.). Šį dėsnį galima išreikšti tokia formule:

$$M = \mu + kD,$$

čia M – mutacijų dažnis, μ – spontaninės mutacijos, D – dozė, k – mutacijų dažnis dozės vienetui.

N. Timofejevas-Resovskis ir Cimeris (K. Zimmer) įrodinėjo dar vieną labai svarbų dėsningumą:

> esant tai pačiai dozės galiai, mutageninis efektas yra vienodas ar ta pačia jonizuojančiosios spinduliuotės doze organizmas paveikiamas iš karto, ar dalimis, frakcijomis.

Moksliškai tai nėra visiškai teisingas teiginys (žr. toliau), bet juo naudojamasi praktiškai. Juo pamatuota asmenų, kontaktuojančių su radioaktyviais šaltiniais, **asmeninė, individuali kontrolė.** Kiekvienas asmuo turi asmeninį dozimetrą, kuris fiksuoja spinduliuotės **suminę dozę**.

Ginčytinas tik vienas klausimas, **kokia dozė yra leistina**. SSSR (pagal S. Jarmolenko. „Radiobiologija čeloveka i životnych", 1988, 283 p.) visi asmenys buvo skirstomi į 3 kategorijas: I – dirbantys profesionaliai padidėjusios spinduliuotės sąlygomis 5, 15, 30 ber/metai (priklausomai nuo organo jautrumo), II kategorija – ribota populiacijos dalis, kuri gyvena padidėjusios spinduliuotės zonoje, – atitinkamai (papildomai) 0,5, 1,5 ir 3 ber/1 metai (bet ne 30 ber/1 metai); III grupė – natūralus spinduliuotės fonas; lygumose jis lygus 0,32 mSv/1 metai, t. y. 3,2 ber/1 metai. Iš jų **trečdalis** (0,105 mSv) tenka **statybinėms medžiagoms**, t. y. mūsų būstui, todėl statybinės medžiagos turėtų būti parenkamos atsižvelgiant į radionuklidų (^{226}Ra, ^{232}Th, ^{40}K) kiekį.

Nustatoma ir maksimali suminė spinduliuotės dozė. Ji irgi diskutuotina.

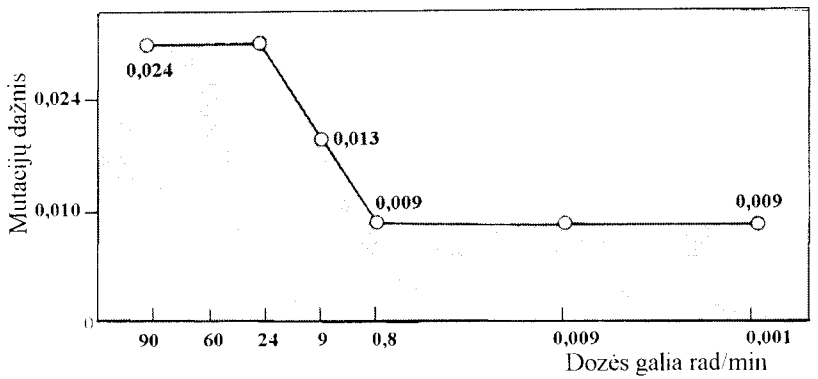
Slenkstinės dozės klausimas. Vienas iš neteisingų ankstyvosios radiacinės genetikos teiginių tai, kad yra slenkstinė dozė. Manyta, jog muatcijos atsiranda tik peržengus tam tikrą slenkstinę dozę. Tačiau buvo įrodyta, kad

> mutacijoms indukuoti slenkstinės dozės nėra.

Ir mažos jonizuojančiosios spinduliuotės dozės sukelia mutacijas, tik atitinkamai mažesniu dažniu. Norint tai įrodyti statistiškai, reikėjo ištirti labai daug ląstelių. Be to, siekiant tyrimus priartinti prie žmogaus, bandymai buvo atliekami su beždžionėmis. Po viso to buvo imtasi svarbių saugos priemonių:

- pasirašyta tarptautinė sutartis dėl atominių bombų bandymų atmosferoje uždraudimo,
- nustota piktnaudžiauti rentgeno spinduliais medicininėje diagnostikoje,
- sumažintos leistinos jonizuojančiosios spinduliuotės dozės.

Švitinant mažomis rentgeno ir γ spindulių dozėmis frakcionuotai, atskirų tipų mutacijų atsiranda patikimai mažiau negu apšvitinus vienkartine doze. Be to, dažnis priklauso nuo dozės galios.



7.3 pav. **Genų mutacijų dažnis pelių spermatogonijose ir jonizuojančiosios spinduliuotės dozės galia:**
mutacijų dažnis apskaičiuotas vienam lokusui apšvitinus 1 rad doze 100 000 gametų (pagal W. L. Russell, 1974)

Raselas (W. L. Russel) nustatė, kad, švitinant peles mažomis ir silpnos galios dozėmis, genų mutacijų būna gerokai mažiau negu intensyviai apšvitinus tokia pat doze (7.3 pav.). Tai patvirtino ir kiti mokslininkai, tyrinėję drozofilą, šilkverpius ir kitus organizmus.

Šie rezultatai aiškinami palankesnėmis organizmų DNR reparacijos sąlygomis, **radioadaptacija, esant foniniam jonizuojančiosios spinduliuotės lygiui**. Žmonių ir gyvūnų lokalinės populiacijos yra atsparesnės jonizuojančiajai radiacijai, kur dėl torio ir radžio 10–100 kartų didesnis spinduliuotės fonas (Keraloje – Indija, kai kuriose Kinijos ir Brazilijos srityse ir kt.).

Didelių jonizuojančiosios spinduliuotės dozių problema. Maksimumo reiškinys. 1939 m. Emonsas (C. W. Emmons) ir Holenderis (A. Hollaender), švitindami grybus ultravioletiniais spinduliais, pirmieji pastebėjo, kad mutacijų dažnis tiesiog proporcingas dozei tik iki tam tikros ribos. Toliau didinant dozę, mutacijų nedaugėja, kartais net mažėja. Vėliau toks dėsningumas nustatytas ir su kitais mutagenais, tarp jų ir su jonizuojančiąja spinduliuote, net neutronais. Tai buvo pavadinta maksimumo reiškiniu. Jis aiškinamas įvairiai:

- **populiacija heterogeniška** mutabilumo atžvilgiu ir yra didesnė mutabilių individų arba ląstelių žūtis, apšvitinus didelėmis dozėmis;
- **didesnė mutantų žūtis** dėl įvairių priežasčių: pakartotinių mutacijų, letalių mutacijų kaupimosi ir kt.;

- didelės mutageno dozės gali **indukuoti DNR reparaciją** arba slopinti klaidingos DNR pažaidų reparacijos tipus;
- **viena mutacija gali neutralizuoti kitą** (pvz., dėl Kriko reversijos) ir kt.

7.2.2. Mutageninio jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio priežastys

Tiesioginis mutageninis poveikis. Taikinio teorija. Jos pamatą sudaro tiesioginė priklausomybė tarp jonizuojančiosios spinduliuotės dozės ir mutacijų dažnio (atmetant mažas ir dideles dozes, žr. aukščiau).

1935 m. N. Timofejevas-Resovskis, bendradarbiaudamas su fizikais Cimeriu (K. Zimmer) ir Delbriuku (M. Delbrück), pasiūlė mutageninį jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį aiškinti „taikinio teorija“. Pagal šią teoriją ląstelėje „šūviai“ į tam tikrus jautrius „taikinius“ energijos kvantu sukelia radiobiologinį efektą. Buvo manoma, kad geno mutacijai atsirasti užtenka vieną kartą pataikyti energijos kvantu į geną, o chromosomų mutacijai – priklausomai nuo mutacijos tipo gali prireikti dviejų pataikymų.

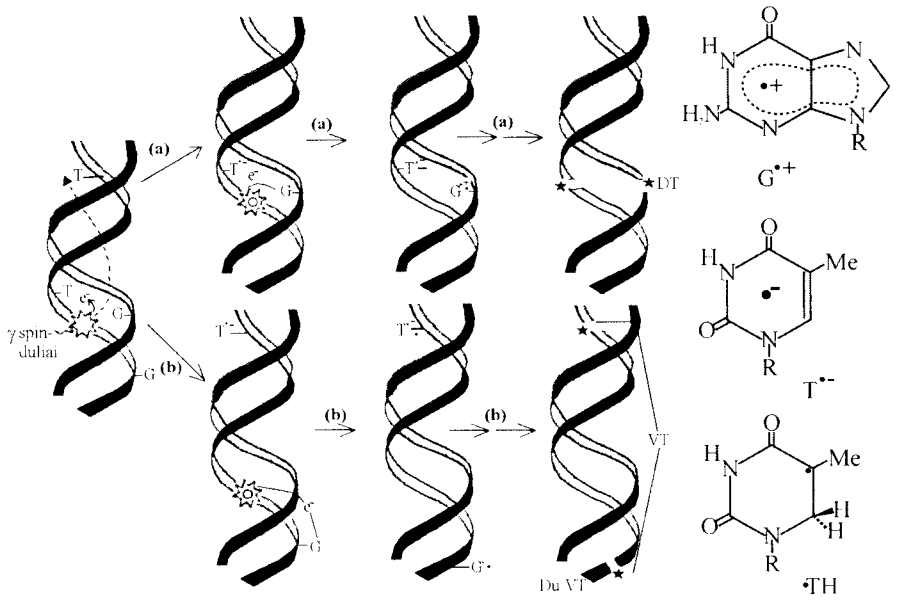
Vadinasi, kuo daugiau „šūvių“ (didesnė spinduliuotės dozė), tuo didesnė tikimybė „pataikyti į taikinį“. Taigi anksčiau išdėstyta mutageninio jonizuojančiuosios spinduliuotės poveikio priklausomybė nuo dozės visiškai atitinka „taikinio teoriją“.

Genas – taikinys, į kurį „šaudoma“ energijos kvantais.

Tačiau vėliau atsirado prieštaraujančių šiai teorijai duomenų. Vieni jų (mutageninio jonizuojančiosios spinduliuotės veikimo priklausomybė nuo frakcionavimo ir dozės galios, mažų ir didelių dozių efektai) atitinka bendrą šiuolaikinę mutagenezės koncepciją, kad genetinės medžiagos pažaida dar nėra mutacija. Kiti priklauso nuo netiesioginio mutageninio jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio.

Kokia DNR pažaidų prigimtis? Kaip energijos kvantas keičia geną? Paradoksalu, bet tipiška tai, kad fizinių mutagenų molekulinio veikimo priežastis tirti sunku, daug sunkiau negu cheminių mutagenų. Prireikė 60 metų, kad paaiškėtų, kaip energijos kvantas sąveikauja su DNR: koks tiesioginio mutageninio poveikio mechanizmas, kokia pirminių DNR pažaidų prigimtis.

Antrinės DNR pažaidos buvo nustatytos gana greitai – tai **DNR vienagrandžiai ir dvigrandžiai trūkiai** (7.4 pav.). Jonizuojantys spinduliai sutrauko DNR grandines. Ši jų savybė panaudojama vėžinėms ląstelėms sunaikinti.



7.4 pav. **Vienagrandžių (VT) ir dvigrandžių (DT) DNR trūkių susidarymas pataikius γ spinduliams į DNR:**
susidaro purino ir pirimidino bazių laisvieji radikalai (LR); jų buvimo vietose atsiranda DNR trūkiai, LR pavaizduoti dešinėje (iš M. C. R. Symons, 1987)

Pirminių DNR pažaidų prigimtis pirmiausia buvo nustatyta tiriant netiesioginį mutageninį jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį.

Netiesioginis mutageninis jonizuojančiosios spinduliuotės poveikis. Drozofilos mutacijas galima sukelti ir apšvitinus mitybinę terpę, kurioje auginamos neapšvitintos muselės. Žinduoliams galima sukelti mutacijas vadinamuoju distanciniu būdu (per atstumą), t. y. švitinant kurią nors kūno dalį, ne pačias lytines ląsteles. Mat švitinant susidaro **antriniai mutagenai**. Jie sukelia netiesioginį mutageninį jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį.

Svarbiausi antriniai mutagenai yra **laisvieji radikalai**. Jie susidaro vykstant vandens radiolizei:

(1) $\sim\!\!\sim H_2O \rightarrow H_2O^+ + \bar{e}$
(2) $H_2O^{\cdot} + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH^{\cdot}$

Susidaro labai reaktyvus hidroksilo radikalas $OH^{\cdot}$.

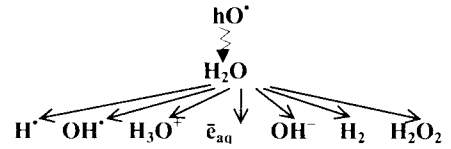
(3) Elektronas irgi sąveikauja su gretimomis vandens molekulėmis. Susidaro labai sužadinta H_2O^*, kuri irgi disocijuoja:

$H_2O^+ + \bar{e} \rightarrow H_2O^* \rightarrow H^{\cdot} + OH^{\cdot}$

Laisvieji radikalai turi nesuporuotus elektronus, todėl labai reaktyvūs, bet jie yra trumpalaikiai – ne ilgiau kaip 10^{-5}s.

Dalyvaujant deguoniui susidaro kiti radiolizės produktai: **hidroperoksidinis radikalas** $HO_2^{\cdot}$, vandenilio peroksidas H_2O_2 ir atominis deguonis **O**. Be to, susidaro hidratuoti elektronai (e^-_{aq}). Jie taip pat labai reaktyvūs.

Suminis vandens radiolizės rezultatas:



Laisvieji radikalai žymimi tašku – $H^{\cdot}$, $OH^{\cdot}$.

Ląstelėje energijos kvantą sugeria stambios organinės molekulės. Susidaro jų laisvieji radikalai ir organiniai peroksidai. Pastarieji atsiranda ir netiesiogiai dėl vandens radiolizės.

Visa tai paaiškina svarbius reiškinius:

- **deguonies efektą** (švitinant augalų šakneles arba drozofilas gryno deguonies aplinkoje, mutacijų būna daugiau, o švitinant azoto aplinkoje, – mažiau negu normalioje aplinkoje);
- **radiojautrumo ryšį su audinių hidratacija** (audiniai, kuriuose yra daugiau vandens, jonizuojančiajai spinduliuotei jautresni už tuos, kuriuose vandens mažiau, pvz., galima palyginti augalų sėklas su vegetatyvinėmis dalimis);
- **distancinį mutageninį spinduliuotės poveikį** (kai apšvitinamas vienas organas, o mutacijos atsiranda kito organo ląstelėse);
- **mutagenus**, kurie atsiranda apšvitintuose maisto produktuose, mitybinėje terpėje.

Genotoksikologiniu atžvilgiu pastarasis reiškinys yra labai svarbus. Apšvitintoje mitybinėje terpėje, maisto produktuose irgi susidaro organiniai peroksidai, H_2O_2. Audiniuose peroksidus skaido fermentai katalazės. Maisto produktuose dažniausiai šių fermentų nėra, todėl peroksidai gana ilgai išlieka. Švitinimas jonizuojančiaisiais spinduliais neatsakingai naudojamas (arba bent bandomas naudoti) maisto produktams sterilinti (pvz., importuotiems grūdams, kurie po to pagal reglamentą turėtų būti naudojami tik pašarui ir tik

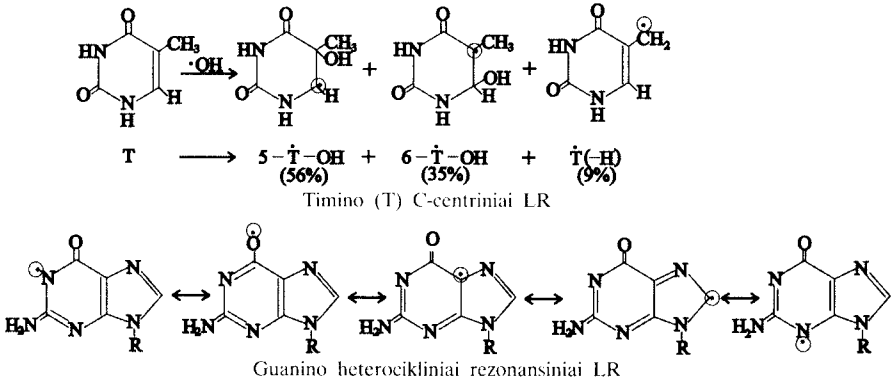
po 3–6 mėn.). Siūloma jonizuojančiaisiais spinduliais švitinti bulvių gumbus, kad šie neleistų daigų, ir pan.

Antrinį mutageninį poveikį sukelia ir **radiotoksinai** – įvairių metabolitų dariniai, atsiradę po apšvitinimo (lipidų peroksidai, chinonai, trikarboninių rūgščių dariniai ir kt.). Įrodytas šių medžiagų mutageniškumas. Ekstraktai iš apšvitintų audinių sukelia chromosomų aberacijas, iš bakterijų – genų mutacijas.

Tiesioginio mutageninio poveikio priežastys. Laisvieji radikalai yra ir pirminės DNR pažaidos: apšvitinus jonizuojančiaisiais spinduliais susidaro purino ir pirimidino bazių laisvieji radikalai. Jie skirstomi pagal tai, kur yra lokalizuotas nesuporuotas elektronas:

- **C-centriniai** C atome, pvz., R—Ċ—R,
- **O-centriniai** O atome,
- **N-centriniai,** pvz., $R_2N\bullet$. Šie bazių laisvieji radikalai dar vadinami **heterocikliniais rezonansiniais**, nes elektronas gali migruoti, sudarydamas bazių laisvųjų radikalų izoformas (7.5 pav.). Dėl bazių laisvųjų radikalų atsiranda vienagrandžiai ir dvigrandžiai DNR trūkiai.

Netiesioginis mutageninis jonizuojančiosios spinduliuotės poveikis gali būti dėl laisvųjų purino-pirimidino bazių radikalų, jeigu šie susidaro netiesiogiai (7.5 pav.). Bazių laisvieji radikalai gali atsirasti migruojant elektronui nuo apšvitintų jonizuojančiaisiais spinduliais baltymų. Elektronas nuo histonų gali migruoti ant DNR. Be



7.5 pav. **C-centriniai (viršuje) ir heterocikliniai rezonansiniai (apačioje) bazių laisvieji radikalai (LR):**
viršuje – elektronas migruoja nuo •OH laisvojo radikalo

to, dėl laisvųjų radikalų baltymuose gali susidaryti saryšos „baltymas-baltymas“, „baltymas-DNR“. Tai trukdo normalią DNR veiklą ir replikaciją.

7.2.3. Ultravioletinė spinduliuotė. Kiti fiziniai mutagenai

Ultravioletinė spinduliuotė (UV) – svarbus ekologinis veiksnys. Kontaktas su ja neišvengiamas. UV yra Saulės spindulių spektre. UV spinduliai skirstomi į tris tarpsnius pagal UV bangos ilgį:

UV A 320–390 nm, *UV B* 280–320 nm,
UV C mažiau kaip 280 nm.

Saulės spinduliuose, pasiekiančiuose žemę, UV lygis yra didelis UVA spektro dalyje, labai sumažėja UVB dalyje ir beveik lygus nuliui – mažiau kaip 290 nm. Trumpesnių bangų UV skleidžia tik baktericidinės lempos.

Biologiniu UV poveikiu susidomėta seniai. Pirmiausia susidomėta **baktericidiniu**, t. y. bakterijas žudančiu UV poveikiu. Po to buvo reklamuojama, kaip naudinga pačiam žmogui pavasarį bei vasarą pasikepinti Saulės spinduliuose. Ypač vaikučiams. Šiuo metu į UV žiūrima kaip į vieną iš pavojingų, bet neišvengiamų aplinkos veiksnių, kurio keliamas pavojus – susirgti **odos vėžiu**. Labiausiai nukenčia neuždengtos nuo Saulės kūno dalys, ypač nosis, smakras, rankos. Žmonės, kurių genotipe yra UV pažaidų reparacijos genų defektas – **pigmentinė kseroderma**, yra labai jautrūs UV ir serga vėžiu 2000 kartų dažniau negu tie, kurių genotipe šie genai lemia normalų jautrumą UV.

Ypač susirūpinimą kelia dėl atmosferos taršos plonėjantis ozono apvalkalas, ozono skylės. Ozono apvalkalas yra toje atmosferos dalyje, kur UV kontaktuoja su deguonimi:

$$3O_2 \rightarrow 2O_3$$

šis apvalkalas susidaro 15–50 km aukštyje. Be to, jo storis keičiasi per metus (tai buvo nustatyta ir Lietuvoje). Jis sugeria didžiąją dalį UV. Ozono sluoksnis ploniausias ekvatoriuje. Ten susirgti odos vėžiu tikimybė didesnė, bet UV sugeria melaninas, kurio vietinė populiacija turi daugiau. Ozono apvalkalą plonina azoto oksidai, ypač chloro bei fluoro angliavandeniliai, freonas.

DNR ypač jautri UV: 240–290 nm srityje DNR sugeria UV 10–20 kartų intensyviau negu baltymai. Šia savybe naudojamasi DNR kiekiui nustatyti.

UV sukeltos DNR pažaidos. Pirimidino dimerai. Nė vieno fizinio mutageno sukeltos DNR pažaidos nebuvo taip lengvai nustatytos, kaip UV. Nulėmė tai, kad šios pažaidos yra pirimidino dimerai, būdingi tik UV. Jokie kiti mutageniniai veiksniai jų nesukelia. Tiesa, pirimidinų dimerus kartais indukuoja ir jonizuojantieji spinduliai, bet taip yra dėl antrinio švytėjimo UV spektro dalyje – dėl Čerenkovo-Vavilovo efekto.

Ciklobutaniniai dimerai (7.6 pav.) sudaro 50–80% visų pažaidų, kurias DNR sukelia UV. Dažniausiai (apie 40–60%) pasitaiko ciklobutaniniai timino dimerai, žymimi T=T, arba T^T, apie penktadalį sudaro dimerai T=C.

Dimerai yra tokios specifinės DNR pažaidos, kad net naudojami UV dozimetrijai – UV sukeltos DNR pažaidos dydžiui įvertinti. Šiuos tyrimus palengvina tai, kad surastas fermentas **UV endonukleazė**, kuri pažįsta pirimidinų dimerus ir toje vietoje kerpa DNR. DNR trūkius lengva aptikti. Iš padidėjusio trūkių kiekio sprendžiama apie DNR daliai tekusių UV dozę. Metodas taikomas ir Lietuvoje, Botanikos institute ir Vilniaus universitete: juo nustatoma UV ir Saulės šviesos spindulių žala augalams, fotoreaktyvacija ir kiti DNR reparacijos tipai.

Manyta, kad mutageninį UV poveikį irgi sąlygoja ciklobutaniniai pirimidinų dimerai. Deja. Pasirodo, ciklobutaniniai pirimidinų dimerai labiau lemia ląstelių žūtį, baktericidinį poveikį. Priežastis – sąryšos toje pačioje DNR grandinėje arba tarp DNR grandinių.

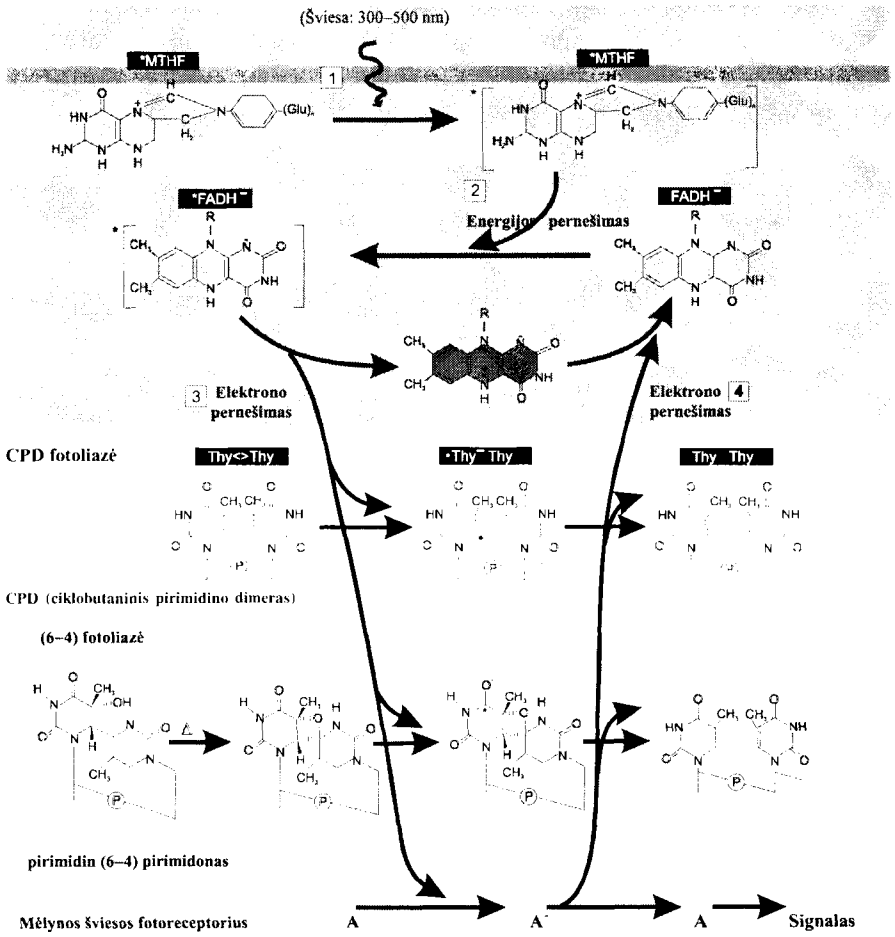
Mutacijos atsiranda dėl kitokio tipo dimerų – **pirimidin-pirimidonų**. Jie yra įvairūs: P (6-4), P (6-2), dar neseniai atrasti. Svarbiausias iš jų **pirimidin(6-4)pirimidonas** (7.6 pav.). Tai potenciali DNR pažaida. Šiuo metu įrodyta, kad ir ciklobutaniniai pirimidinų dimerai netiesiogiai gali būti mutacijų priežastis.

Potenciali DNR pažaida dar nėra mutacija, bet gali būti jos priežastis. Tik potencialios DNR pažaidos yra mutageniškos.

Kancerogeninis UV poveikis yra ne dėl bendro UV poveikio DNR, o dėl kai kurių genų mutacijų, kurias sukelia UV. Ypač detaliai ištirtos p^{53} geno mutacijos. Pirma, nustatyta, kad odos vėžiu sergančiųjų vėžinėse ląstelėse p^{53} geno mutacijos įvykusios dipirimidinų vietose (pvz., CC→TT). Taigi aiški tiesioginė sąsaja tarp DNR pažaidų, UV mutageniškumo ir vėžio. Antra, p^{53} geno mutacijos yra recesyviosios, vadinasi, **vėžys vystosi tik tokiose ląstelėse, kuriose abu aleliai yra mutantiniai.**

Saulės šviesa apie 60% odos vėžio atvejų sukelia dėl mutacijų abiejuose p^{53} geno aleliuose:

$$\frac{p^{+53}}{p^{+53}} \xrightarrow[\text{UV}]{\text{Saulės}} \frac{p^{53}}{p^{+53}} \xrightarrow[\text{UV}]{\text{Saulės}} \frac{p^{53}}{p^{53}}$$



7.6 pav. **CPD ir (6-4) fotoliazių veikimo būdas:**
1 – mėlynos šviesos fotoną sugeria MTHF (5,10-meteniltetrahidrofolatas) antena; *2* – energijos pernešimas ant $FADH^-$ (flavinadenindinukleotido); *3* – sužadintas flavinas atiduoda elektroną CPD (ciklobutaniniam pirimidino dimerui) arba (6-4) fotoproduktui (pirimidin(6-4)pirimidonui); *4* – elektrono pertvarka grąžina DNR bazes į pradinę būseną (monomerus), o elektronas vėl grąžinamas $FADH^-$ (piešinys ne įsiminti, o suvokti fotoreaktyvacijos eigą) (remiantis A. Sancar, 1996)

Kiti fiziniai mutagenai yra nepalyginamai menkiau ištirti. Be to, jų poveikis dažnai netiesioginis – kaip cheminių reakcijų katalizatoriaus. Net matomos šviesos spinduliai, ypač UV, sukelia cheminių medžiagų pokyčius – fotolizę. Dėl fotodinaminių reiškinių, dalyvaujant kitiems aplinkos veiksniams – O_2, NO_2, nitratams ir nitritams, pvz., gaminasi labai stiprūs kancerogenai **nitrozoaminai** (žr. toliau). Savo ruožtu iš nitrozoaminų dėl UV poveikio gali gamintis kita mutagenų grupė **hidroksilaminai**:

$$\underset{\text{antriniai aminai}}{(NO_2 + O_2)} \xrightarrow{UV} N_2O_3 \xrightarrow{UV} \underset{\text{nitrozoaminai}}{\quad} \xrightarrow{UV} \underset{\text{hidroksilaminai}}{\quad}$$

Saulės šviesoje policiklinių aromatinių angliavandenilių (benz(a)pireno, žr. toliau) mutageniškumas padidėja iki 10 kartų. Dar stipresni mutagenai (100 kartų aktyvesni) susidaro šiuos junginius apšvitinus UV.

Fotodinaminius reiškinius – biologinių, tarp jų ir genetinių, struktūrų, pažeidimą sugeriant šviesą gali skatinti **fotosensibilizuojančios cheminės medžiagos**. Tai akridinai, acetonai, antrachinonai, porfirinai, riboflavinas, kosmetiniai UV spindulių sugėrikliai (medžiagos, skatinančios įdegimą). Iš šios grupės medžiagų geriausiai ištirti psoralenai.

Psoralenai – furokumarinų mišinys, gaunamas iš augalo *Psoralea drupacea*. Jie sensibilizuoja odą UV spinduliams, todėl vartojami kaip vaistai odos baltmei (viligui, leukodermai), lizdinei alopecijai (plikimui) gydyti. Tai bifunkciniai junginiai, turintys dvi su DNR reaguojančias grupes. Dėl šios priežasties jie iš karto jungiasi su dviem pirimidinais. Atsiranda sąryšos tarp dviejų DNR grandinių (DNR–DNR). Šio tipo DNR pažaidos mirtinos. DNR–DNR sąryšas sukelia *Fusarium* genties grybų nuodų – aflatoksino B_1 ir B_2 fotoproduktai, taip pat alkaloidas iš *Rutaceae* š. augalų **distamicinas.** Šis stiprus, pavojingas fotosensibilizuojantis rūtų poveikis gerai žinomas. Lietuvoje yra nukentėję maži vaikai ir rūtų darželius ravinčios moterys.

Temperatūros poveikis. 1933 m. M. Navašinas ir Peto (P. Peto) nustatė, kad gamtinių mutacijų dažnis labai padidėja augaluose, užaugusiuose iš senų sėklų (pvz., senuose miežių grūduose chromosomų aberacijų 7 kartus daugiau). Augalų sėklas galima dirbtinai susendinti, jeigu jas laikysime aukštesnėje (net kambario) temperatūroje.

Pirolizės (gr. *pyr* – ugnis + *lysis* – skaidymas) produktai nitrozoaminai, policikliniai arenai (aromatiniai angliavandeniliai), aminorūgščių ir polipeptidų pirolizatai bus nagrinėjami atskirai. Jie susidaro kaip degimo produktai, kai temperatūra aukštesnė kaip 150°C.

Elektromagnetinės bangos – naujas mutageniškas veiksnys, neseniai įtrauktas į mutagenų sąrašus. Vis dėlto duomenys gana prieštaringi, kaip ir apie ultragarsą, bet įspėjimas nepiknaudžiauti yra rimtas.

Vibracija. Jos mutageniškumas buvo nustatytas po antrojo kosmonauto G. Titovo skrydžio. Labai purtė. Drozofilos ir kitų organizmų, tarp jų žinduolių, ląstelėse padidėjo chromosomų aberacijų, genų mutacijų, o virusas, kuris buvo jonizuojančiųjų spindulių indikatorius, nereagavo. Vibracija kaip mutageninis veiksnys yra labai mažai tirtas, nors yra daug žmonių profesijų, kur jos žala gali būti ne tik fiziologinė (pvz., moterų nevaisingumas), bet ir genetinė.

7.3. Cheminiai mutagenai

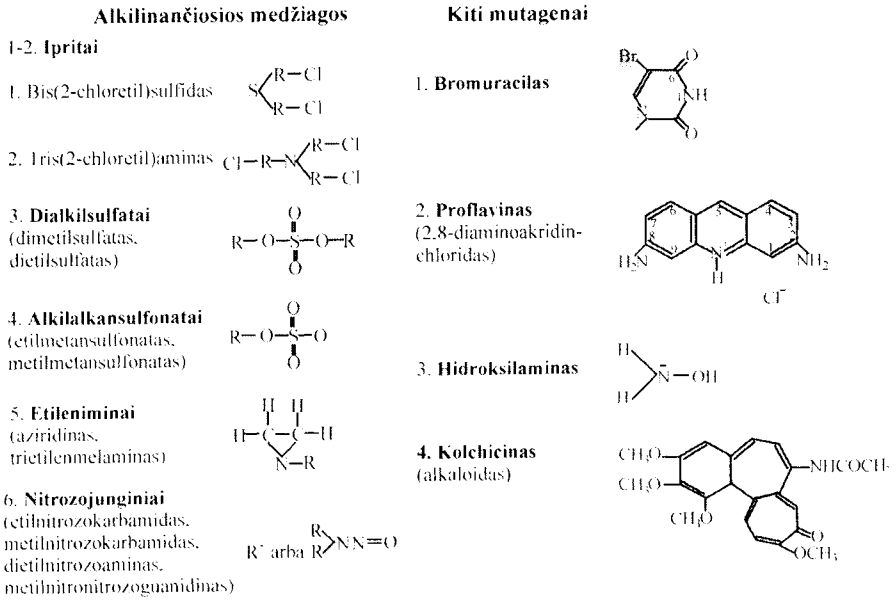
Cheminių mutagenų atradimas. Cheminė mutagenezė prasidėjo nuo silpnų mutagenų. 1932 m. V. Sacharovas nustatė, kad drozofilų mutacijas sukelia cheminiai junginiai jodas, metalų (vario, mangano, švino) druskos, kancerogeninis junginys metilcholantrenas. Tačiau visi šie junginiai yra silpni mutagenai. Jų valanda „išmušė“ tik po 40 metų, kai rimtai susidomėta **aplinkos mutagenais**.

Cheminė mutagenezė viešai pripažinta tik po to, kai Auerbach (C. Auerbach) ir J. Rapoportas aptiko labai stiprius mutagenus – **alkilinančiąsias medžiagas**. Auerbach įrodė, kad mutacijas sukelia ipritai, o J. Rapoportas aptiko keletą itin stiprių mutagenų (etil- ir metilnitrozokarbamidus, metilmetansulfonatą, dimetilsulfatą, aziridiną ir kt.).

Cheminius mutagenus sugrupuoti sudėtinga, nes mutacijas sukelia labai įvairios medžiagos. Jų yra šimtai tūkstančių. Čia paminėti tik kai kurie cheminiai mutagenai, grupuojami pagal cheminį-biologinį junginio veikimą. Kai kurių mutagenų formulės pateiktos 7.7 paveiksle.

1. **Alkilinančiosios medžiagos** – stipriausi mutagenai. Šiai grupei priklauso daug priešvėžinių preparatų. Alkilo grupės – metilo (CH_3), etilo (C_2H_5), propilo (C_3H_7) ir kt. – nuo alkilinančiųjų medžiagų pereina į alkilinamąjį junginį. Prisiminkime, kad alkilinimas (metilinimas) yra ir įprasta DNR modifikacija. Vadinasi, DNR alkilinimas vyksta ne tik dėl mutagenų, tai ir normalus reiškinys.

2. **Peroksidai** susidaro organizme kaip metabolizmo produktai. Jie gali būti organiniai ir neorganiniai (H_2O_2). Šios medžiagos sukelia



7.7 pav. **Įvairūs cheminiai mutagenai**

mutacijas, generuodamos laisvuosius radikalus (OH·), kurie jungiasi su DNR.

3. **Antimetabolitai**, tarp jų ir purino-pirimidino bazių analogai (kofeinas, teofilinas, teobrominas, bromuracilas, fluoruracilas, 2-aminopurinas ir kt.). Mutacijas sukelia ir kitų medžiagų (pvz., vitaminų) analogai (aminopterinas, folio rūgšties dariniai ir kt.). Antimetabolitai konkuruoja su metabolitais, užimdami šių vietą, tačiau nepasižymi biologiniu veikimu, būdingu metabolitui, todėl sutrinka metabolizmas arba normali reakcijų eiga, pavyzdžiui, DNR replikacija arba transkripcija.

4. **Alkaloidai ir gliukozidai**, tarp jų minėtasis alkaloidas kolchicinas, sukeliantis beveik vien tik poliploidiją. Alkaloidų ir gliukozidų mutageninis poveikis gali būti ir netiesioginis: susidaro mutageniški jų sąveikos su kitais veiksniais produktai. Antai iš nikotino ir kitų alkaloidų gali pasigaminti nitrozoaminai.

5. **Akridinai** – medžiagos, vartojamos kaip fluorescuojantieji dažai. Nėra stiprūs mutagenai, bet vartojami todėl, kad sukelia tik rėmelio poslinkio mutacijas.

6. **Hidroksilaminas, hidrazinas, nitrito rūgštis** (HNO_2), **oksiduojančiosios-redukuojančiosios medžiagos**. Veikia įvairiai, pvz. nitrito rūgštis deaminina purinų-pirimidinų bazes.

7. **Sunkiųjų metalų druskos**. Mutacijas gali sukelti ir lengvųjų metalų (berilio, kalcio, magnio) druskos. Tai labai priklauso nuo organizmų, ląstelių tipo ir būklės.

Cheminių mutagenų ypatumai. Veikimas panašus į fizinių mutagenų: mažos mutagenų koncentracijos yra stimuliuojančios; veikiant mutagenu ilgą laiką keletoje kartų vyksta adaptacija, padidėja atsparumas; mutageniškumas labai priklauso nuo organizmo: pvz., minėta nitrito rūgštis yra stiprus mutagenas bakterijoms, bet tiesiogiai sąveikaujant su DNR silpnas arba visiškai nemutageniškas žinduoliams. Gali būti tiesioginis ir netiesioginis mutageninis poveikis. Be to, gali būti netiesioginiai mutagenai – **promutagenai**. Pats junginys mutacijų nesukelia, bet mutageniški jo biodegradacijos produktai. Tokio tipo mutagenams aptikti yra specialus Eimso metodas – inkubuoti tiriamąją medžiagą su mikrosomų (S-9) frakcija iš graužikų kepenų.

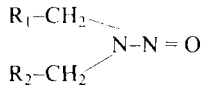
7.3.1. Cheminiai mutagenai, susidarantys po įvairių sąveikų

7.8 pav. **Žiurkės inkstų vėžys dėl poveikio nitrozodimetilaminu:**
vienkartinė dozė 30 mg/1 kg kūno masės

Nitrozoaminai. Tai nekeliantys abejonių stiprūs kancerogenai. Pakako žiurkei gauti vienkartinę 30 mg/kg kūno masės dimetilnitrozoamino dozę, ir išsivystė inkstų vėžys (7.8 pav.). Pagal genotoksinį pavojų nitrozoaminus lenkia tik laisvieji radikalai.

Nitrozoaminai – junginiai, kurie turi nitrozo grupę N=O.

Bendra jų formulė:



Susidaro įvairiais būdais:
- dėl fotodinaminių reiškinių (UV),
- pirolizės,
- cheminių reakcijų, kuriose dalyvauja mikroorganizmai.

Vienas iš būdų nitrozoaminams susidaryti iš nitratų:

(1) $2HNO_3 \rightarrow 2HNO_2 + O_2$,
(2) $2HNO_2 \rightarrow N_2O_3 + H_2O$.

Virškinamajame trakte šias reakcijas vykdo mikroorganizmai.

Nitrozuojantieji junginiai jungiasi su antriniais aminais ir susidaro **nitrozoaminai**:

$$(3)\ \begin{matrix} R_1\text{–}CH_2 \\ \\ R_2\text{–}CH_2 \end{matrix} \!\!> NH + N_2O_3 \rightarrow \begin{matrix} R_1\text{–}CH_2 \\ \\ R_2\text{–}CH_2 \end{matrix} \!\!> N\text{–}N = O + HNO_2$$

Kai kurios genotoksikologinės išvados. Dėl nitratų labai daug triukšmauta. Buvo didelis nitratų tikrinimo daržovėse, bulvėse vajus, siūloma žemdirbystė be mineralinių trąšų, t. y. švari. Bet nitratai augalui – maistas. Čia būtina bendrais bruožais prisiminti nitratų apykaitą augaluose:

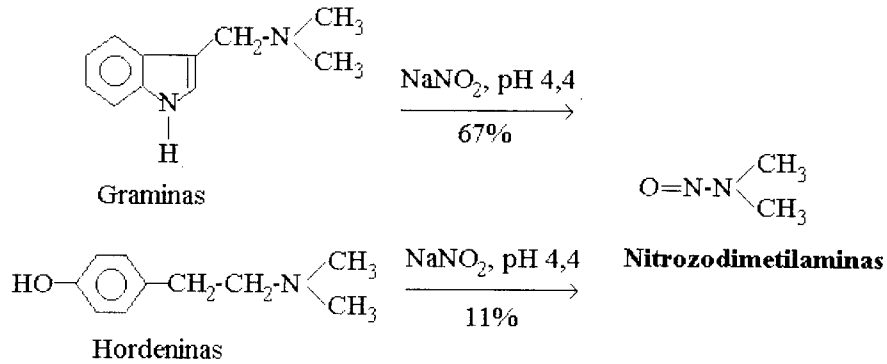
- patenka pro šaknis,
- pernešami į lapus ir ten perdirbami.

Šiuos virsmus slopina silpnas apšvietimas ir žemesnė temperatūra. Kaip tik tokios sąlygos yra žiemą ir anksti pavasarį šiltnamiuose. Tada žaliose augalo dalyse nitratų padaugėja.

Gamtoje viskas labai suderinta: stipriausias nitrozoaminų susidarymo slopiklis (inhibitorius) yra askorbo rūgštis (vitaminas C), kurios daug yra daržovėse. Kai dėl švarios žemdirbystės – vietoj mineralinių trąšų naudoti organines trąšas (mėšlą), susipažinus su ksenibiotikų biodegradacija (žr. p. 303) paaiškėja, kad šalinimo produktuose susikaupia didžiausi teršalų kiekiai. Vadinasi „švari" žemdirbystė yra pati nešvariausia.

Daržovėse ir kituose maisto produktuose reikėtų kontroliuoti ne tik nitratų, bet ir galutinio kancerogeniško produkto nitrozoaminų kiekį. Kad tai būtina, rodo Vokietijos pavyzdys. Vidutiniškai vienas vyras per parą Vokietijoje su maisto produktais gauna 1,1 μg nitrozoaminų, iš jų 0,7 μg, t. y. 63%, gerdamas alų (pagal O. R. Preussman, R. G. Eisenbrandt, 1987).

Iš kur aluje tiek nitrozoaminų? Juk miežių grūduose nitratų nėra. Nitrozoaminai aluje pasigamina iš antrinių aminų. Miežių grūduose yra du alkaloidai, kuriems žmogus visiškai atsparus. Iš jų susidaro svarbiausias maisto produktų nitrozoaminas – **nitrozodimetilaminas**.



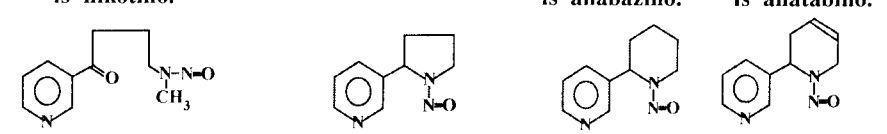
Jeigu būtų pasitenkinama tik nitratų analize, alus būtų labai švarus ir sveikatai nepavojingas gėrimas. Jame nitrozodimetilamino atsiranda dėl pirolizės – šilumos poveikio. Kuo alus tamsesnis, tuo daugiau jame nitrozoaminų.

Nitrozoaminų šaltinis maiste priklauso ir nuo tautos, lokalinių populiacijų tradicijų. Antai japonai per parą gauna 1,5 karto daugiau nitrozoaminų negu vokiečiai, bet alui tenka labai menka jų dalis; 91% nitrozoaminų tenka rūkytai žuviai.

Vadinasi, maisto produktuose nitrozaminai atsiranda dėl metabolizmo (dalyvaujant mikroorganizmams) arba dėl maisto ruošimo technologijos (aluje ar rūkytoje žuvyje).

Rūkymo žala. Rūkalai – pats pavojingiausias nitrozoaminų šaltinis. JAV atliktais tyrimais šioje šalyje anksčiau rūkymui teko 85% mirčių nuo plaučių vėžio, 50–70% – nuo burnos ir kvėpavimo takų vėžio, apie 50% – nuo šlapimo pūslės vėžio, 30–40% nuo kasos vėžio. Svarbiausi tabako gaminių kancerogenai yra nitrozoaminai, iš kurių itin stiprus kancerogenas yra **butanonas**. Tabake nitrozoaminai yra pirolizės (ruošiant žaliavą ir pačiu rūkymo momentu) produktai. Jie pasigamina iš tabake esančių alkaloidų:

iš nikotino: **iš anabazino:** **iš anatabino:**



4-(metilnitrozoamino)-1-(3-piridil)-1-butanonas

N'-nitrozonornikotinas

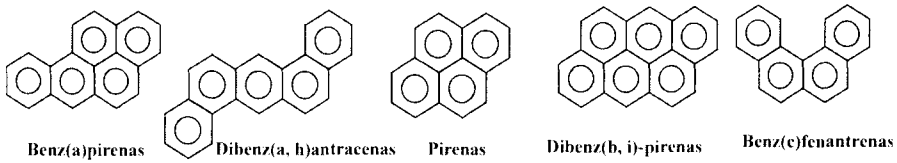
N'-nitrozoanabazinas

N'-nitrozoanatabinas

Gumos pramonė ir jos produktai – vienas didžiausių nitrozoaminų šaltinių. Jų yra net vaikiškuose guminiuose žindukuose ir žaisluose. Visi, kurių profesija susijusi su gumos gamyba arba vartojimu, gauna daug nitrozoaminų.

Nustatytos žmogaus ligos, kuriomis sergant gali padidėti nitrozoaminų kiekis (achlorhidrija, gastritas, infekciniai šlapimo trakto uždegimai).

Policikliniai arenai, arba **policikliniai aromatiniai angliavandeniliai (PA),** yra nevisiško angliavandenilių degimo produktai. Pasigamina 200–300°C degant miškams, žolei, akmens anglims, naftos produktams. Žinotina, kad juos kaupia augalai (dėl to pavojinga žemdirbystė pakelėse). Tai arenai (aromatiniai angliavandeniliai), turintys kelis benzeno fragmentus:



Benz(a)pirenas Dibenz(a, h)antracenas Pirenas Dibenz(b, i)-pirenas Benz(c)fenantrenas

Mutageninės savybės nustatytos daugiau kaip 200 PA, bet jie yra **netiesioginiai mutagenai.** Būtina jų aktyvacija. Juos gali aktyvinti azoto oksidai, nitrito rūgštis, fermentai, todėl labai smulkiai ištirtas jų metabolizmas (žr. 4.8 pav.).

Polipeptidų ir aminorūgščių pirolizės produktus atrado japonų mokslininkai paskrudusioje, apdegusioje mėsoje. Sutarta dėl jų žymėjimo. Aminorūgščių pirolizatai žymimi taip:

- pirmiausia nurodoma aminorūgščių santrumpa,
- P – pirolizės produktas, o skaičiai – pagal pirolizato atradimo seką:
  - **Trp-P-1** – 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirolo [4,3-b] indolas,
  - **Trp-P-2** – 3-amino-1-metil-5H-pirolo [4,3-b] indolas,
  - **Glu-P-1** – 2-amino-6-metildipirido [1,2-a: 3,2'-b] indolas.

Kitas **(poli)peptidų pirolizatų** žymėjimas:

- **MeIQ** – 2-amino-3,4-dietilimidazo [4,5-f] chinolinas (abu po kreatinino + gliukozės + aminorūgšties pirolizės),
- **-MeIQx** – 2-amino-3,7,8-trimetilimidazo [4,5-f] chinoksalinas (tos pačios medžiagos + glicinas) ir kt.

Kaip ir PA, aminorūgščių pirolizatai yra **netiesioginiai mutagenai.** Juos aktyvina tie patys veiksniai, kaip ir PA (azoto oksidai, nitritai, fermentai), bet kai kurie jų (Trp-P-2, Glu-P-1) yra 150 kartų stipresni mutagenai už PA.

Kitų medžiagų pirolizė kol kas nepakankamai ištirta. Trūksta kavos (kaitinant iki 150–300°C), augalinių aliejų, fosfolipidų pirolizatų tyrimų, nors yra darbų apie šių pirolizatų mutageniškumą.

Mutageniniai nitritų sąveikos su kai kuriais vaistais produktai. Po šios sąveikos gali susidaryti **tiesioginiai mutagenai.** Sąrašas vaistų, kuriems nustatytas toks rezultatas, gana ilgas, todėl vartojančiajam vaistus reikėtų tai žinoti. Stiprūs mutagenai susidaro nitritams sąveikaujant su aminofenazinu, kai kuriais antiparazitiniais vaistais, silpni mutagenai – su analginu, paracetamoliu, fenacetinu.

Tiesioginiai mutagenai susidaro ir **nitritams, azoto oksidams sąveikaujant su kai kuriais gamtiniais junginiais**: alkaloidais, fenoliais, indolais, net aminorūgštimis (triptofanu).

Mutagenai – mikroorganizmų veiklos produktai. Fekapentenai. Nitrozoaminai – ne vieninteliai žmogų veikiantys mutagenai, atsirandantys žarnyne dėl mikroorganizmų veiklos. Kai kurie mikroorganizmai turi fermentą **fekalazę,** kuri **augalinius gliukozidus** paverčia mutageniniais junginiais. Žinduoliai nuo šio reiškinio apsisaugo savotiškai: gliukozidai labai skubiai (kol jų nepaveikė mikroorganizmai) deponuojami kepenyse. Ten juos perdirba fermentai.

1981 m. atrasta nauja mutagenų grupė **fekapentenai.** Tai (S)-3-(1,3,5,7,9-dodekapetoniloksi)-1,2-propandioliai, konjugavę su laurilgliceroliu. Skaičius po medžiagos pavadinimo rodo anglies atomų skaičių neišsišakojusioje molekulės dalyje – fekapentenas-12, 14 ir pan. Prisiminkime, kad buvo storosios žarnos vėžio epidemijos tarp Johanesburgo (Pietų Afrikos Respublika) baltaodžių gyventojų priežastis. Laurilglicerolis yra detergentas, įeinantis į priemones, vartojamas indams plauti.

7.3.2. Laisvaradikalinė mutagenezė. Ligos, kurioms būdinga sutrikusi laisvųjų radikalų pusiausvyra

Laisvųjų radikalų apibūdinimas. Prisiminkime, laisvieji radikalai – grupės atomų ir atomai, turintys nesuporuotą elektroną. Jie labai įvairūs. Mutagenezei svarbūs laisvieji radikalai, kurie atsiranda esant deguonies atomui: **•OH** (hidroksilinis radikalas), $O_2^{\bullet}$ (superoksidinis radikalas), jau minėtieji purino-pirimidino bazių laisvieji radikalai.

Laisvieji radikalai (LR) yra labai reaktyvūs, bet trumpalaikiai, todėl itin pavojingi tie iš jų, kurie išlieka ilgesnį laiką. Šiuo atžvilgiu išsiskiria $O_2^{\cdot-}$. Jis laikomas labai genotoksišku. Hidroksilinis radikalas gali sukelti DNR pokyčius tik tiesioginėje DNR aplinkoje. Genotoksiškai aktyvus ir **singlentinis deguonis** $^1O_2$, kurį produkuoja fotodinaminiai sensibilizatoriai, o ląstelėse susidaro vykstant lipidų peroksidacijai. $^1O_2$ mažiau reaktyvus, bet difuzijos kelias ilgesnis, negu •OH.

Labai svarbus reiškinys – peroksidų susidarymas iš LR, pvz.,

$$HO_2^{\cdot} + HO_2^{\cdot} \rightarrow H_2O_2 + 2O$$

Kaip minėta, peroksidai išlieka ilgesnį laiką. Kitas labai svarbus reiškinys – organinių peroksidų susidarymas, ypač lipidų peroksidacija. Dėl jos nukenčia, griaunama ląstelės **membranų sistema**. Tai atveria kelią mutagenams. Be to, lipidų peroksidai yra **ilgalaikiai**.

Padidėjusi lipidų peroksidacija yra vienas iš svarbių organizmo sutrikusios laisvaradikalinės būsenos rodiklių.

Senstant, sutrikus laisvųjų radikalų ir antioksidantų pusiausvyrai (7.1 lentelė), padidėja lipidų peroksidacija. Tai priešvėžinė būsena.

Laisvųjų radikalų bei antioksidantų pusiausvyra ir jos pokyčiai. LR susidaro vykstant įvairiems procesams, dėl įvairių fermentų (tarp jų NADPH-citochrom P-450 reduktazės) veiklos. Labai svarbūs laisvaradikaliniai vyksmai centrinėje nervų sistemoje.

Paprastai nusistovi **pusiausvyra** tarp laisvųjų radikalų susidarymo ir antioksidantų kiekio. Antioksidantai, tioliai (tarp jų glutationas) yra laisvųjų radikalų **gaudyklės** ir jų slopikliai.

Antioksidantai vartojami ir kaip maisto priedai, nes irgi vyksta maisto produktų oksidacija, susidaro peroksidai.

Nustatytos ligos, kuriomis sergant sutrinka laisvųjų radikalų ir antioksidantų pusiausvyra, padaugėja laisvųjų radikalų (7.1 lentelė).

Sutrikusi laisvųjų radikalų pusiausvyra pirmiausia būdinga **senatvei**. Senstant sutrinka LR ir antioksidantų pusiausvyra. **Ankstyvosios senatvės** sindromams irgi būdingas gerokai pakilęs LR lygis.

Antra grupė ligų – **virusinės ir kitos infekcijos**, sukeliančios **uždegiminius procesus**. Vyksta vadinamasis „**kvėpavimo sprogimas**“: aktyvinami polimorfobranduoliai leukocitai neutrofilai. Jie gamina $O_2^{\cdot}$ ir H_2O_2. Tai lazda su dviem galais: viena, tai būdas suskaidyti svetimą (virusinę) nukleorūgštį (nebūtinai DNR, bet ir RNR, kaip, pvz., sergant gripu), ir antra, aktyvinti neutrofilai yra stipriai mutageniški gretimoms ląstelėms. Lėtiniai uždegimai yra priešvėžinė būsena. Kitos ligos, kuriomis sergant sutrinka LR pusiausvyra, labai įvairios:

- **ligos, susijusios su deguonies apykaita.** Tai kraujagyslių, širdies, kraujo ligos, mažakraujystė, ischeminė liga, miokardo infarktas, aterosklerozė, hipertonija;
- **autoimuninės ligos, alergijos.** Reumatoidiniu artritu sergantys eksperimentiniai gyvuliukai (pelių, žiurkių genetinės linijos) yra modelis sutrikusiai LR pusiausvyrai tirti ir gydyti;
- **psichikos ir nervų ligos** (Parkinsono, Alheimerio, schizofrenija, epilepsija, maniakinė-depresinė psichozė). Pvz., sergant schizofrenija, septynis kartus padaugėja lipidų peroksidų;
- **peroksisominės ligos** – dažnai pasireiškia kaip nervų bei psichikos ligos. Jų priežastis – sutrikusi peroksisomų pusiausvyra. **Peroksisomos** – tai ląstelės organoidai, kuriuose yra oksidacijos fermentai (katalazė, uratoksidazė ir kt.).

7.1 lentelė. **Kai kurios žmogaus ligos, kuriomis sergant sutrinka laisvųjų radikalų ir antioksidantų pusiausvyra; jų ypatybės** (pagal V. Rančelį, 1993)

Ligos	Išskirtinės ypatybės							Ligos	Išskirtinės ypatybės						
	1	2	3	4	5	6	7		1	2	3	4	5	6	7
DNR REPARACIJOS								**AUTOIMUNINĖS**							
Pigmentinės kserodermos	+	+	+		+			Kolagenozės (sisteminė raudonoji vilkligė)	+	+	+		+		+
Ataksija-telangiektazija	++	+	+		-		+	Reumatoidinis artritas			+		+		
Bliūmo s.	++	+	+	+	+		+	**LĖTINIAI UŽDEGIMAI**					+		+
Fankonio mažakraujystė	++	+	+	+	+	+	+	Jungiamojo audinio	+						+
NERVŲ-PSICHIKOS								Kepenų	+						+
Epilepsija						+		**KITOS LIGOS**							
Schizofrenija	-		+?			+		Dauno s.	+		+?	+	+		
Parkinsono l.	+			+		+		Kai kurie lūžūs chromosomų saitai	+						
Alheimerio l.	+		+			+		Diabetas	+	+	+	+			+
SENATVĖ								Alkoholizmas				+		+	+
Normali	+			+		+		Emfizema							
Ankstyva	+		+			+		Raumenų distrofija							
KRAUJAGYSLIŲ-KRAUJO-ŠIRDIES								Dermatitai							+
Mažakraujystė							+	Skrandžio ir dvylikapirštės žarnos opa							+
Talasemijos	+						+	Ūmi plaučių edema							
Ischeminė l.							+	Lėtinis osteomielitas							
Aterosklerozė				+			+								
Miokardo infarktas							+								
Hipertonija							+								

Pastabos: s. – sindromas; l – chromosomų lūžumas (++ chromosomų lūžumo sindromas, + silpnas); 2 – didesnis jautrumas mutagenams (dažniausiai specifiniams); 3 – DNR reparacijos defektai; 4 – sistemų, veikiančių iki sąveikos „DNR-mutagenas“, pokyčiai, antimutagenų stoka; 5 – imunodeficitas; 6 – didesnė lipidų peroksidacija; 7 – susidaro klastogeniniai veiksniai.

Padidėjęs peroksisomų dalijimasis tiek pat pavojingas, kiek ir sumažėjęs. Jų dalijimąsi skatina kai kurie vaistai, mažinantys lipidų kiekį kraujyje (klofibratas ir kt.).

LR ir DNR reparacija. Labai įdomus ryšys tarp DNR reparacijos ir laisvųjų radikalų pusiausvyros. Visų šiuo atžvilgiu tirtų asmenų, kuriems sutrikusi LR pusiausvyra, ląstelėse slopinama arba susilpnėjusi DNR pažaidų reparacija, todėl dar labiau sustiprėja genotoksinis poveikis. Ir atvirkščiai, tų žmogaus ligų, kurios apibūdinamos kaip DNR reparacijos ligos ir kurių pirminė priežastis tikrai yra vieno kurio nors konkretaus, nustatyto DNR reparacijos geno mutacija, yra sutrikusi LR pusiausvyra. Tai nustatyta pigmentinėms kserodermoms, Fankonio mažakraujystei, Bliūmo sindromui, ataksijai-telangiektazijai (apie jas bus smulkiau).

Sąrašas vis ilgėja. Padidėjęs LR kiekis nustatytas ir sergant Dauno sindromu, diabetu, alkoholizmu, raumenų distrofija, skrandžio ir dvylikapirštės žarnos opa, chronišku hepatitu ir osteomielitu (kaulų čiulpų uždegimu) ir kt.

Ligoms, kai pasireiškia sutrikusi laisvųjų radikalų pusiausvyra, būdinga:

- padidėjęs chromosomų aberacijų ir/arba seserinių mainų dažnis – silpnas chromosomų nestabilumas, o kai kurioms DNR reparacijos ligoms – chromosomų lūžumo sindromai; sergant kai kuriomis laisvaradikalinėmis ligomis, susidaro **klastogeniniai veiksniai**; jie sukelia chromosomų aberacijas ir sveiko organizmo ląstelėse (pavojinga valgyti sergančio gyvulio mėsą);
- didesnis jautrumas konkrečiam arba apskritai mutagenams;
- silpnesnė DNR pažaidų reparacija ir antimutagenezė;
- silpnesnis imunitetas;
- didesnė lipidų peroksidacija (7.1 lentelė).

Įdomu tai, kad šios savybės nustatytos ir miežių laisvaradikaliniam pleiotropiniam monogeniniam mutantui *tweaky spike*.

Egzogeniniai veiksniai, produkuojantys laisvuosius radikalus. Pagrindinis egzogeninis laisvųjų radikalų šaltinis yra **ksenobiotikai**: esant H_2O_2 ir NADPH, generuojamas $O_2^{\cdot}$ (superoksidinis radikalas).

Hidroksilinis radikalas •OH gali susidaryti dėl peroksido H_2O_2 sąveikos su keičiančiais valentingumą Cu arba Fe jonais:

$$Me^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Me^{(n+1)} + OH^{\cdot} + OH^{\cdot}.$$

Panašiai susidaro ir askorbo rūgšties LR, todėl nerekomenduojama citriną pjaustyti metaliniu peiliu. Bet vėlgi lazda su dviem galais: nitrozoaminų susidarymą stipriau slopina askorbo rūgšties laisvasis radikalas.

LR sukelia matoma šviesa ir ypač UV.

LR produkuojantys veiksniai tokie svarbūs kaip kancerogenai, kad Eimsas (B. N. Ames) sukonstravo specialius *Salmonella typhimurium* kamienus TA102, ypač – **TA104,** tinkamus laisvaradikalinei mutagenezei nustatyti.

Antioksidantai. Saugos preimonės. Laisvieji radikalai – įprastas ląstelės reiškinys. Skiriami du LR lygiai:

- **normalus**: per parą ląstelė patiria apie 1000 laisvaradikalinių smūgių;
- **oksidacinio streso**, kai šis normalusis lygis viršijamas.

Apsauga veikia abiem lygiais. Nuo ne laiku ir ne vietoje atsiradusių LR ląstelė apsisaugo įvairiais būdais. Pirmiausia apsaugotas branduolys.

Ląstelės branduolys yra silpniausiai oksigenizuotas ląstelės organoidas.

Laisvuosius radikalus likviduoja:

- **LR gaudyklės.** Tai įvairios gamtinės medžiagos (ubichinonai, kai kurie steroidiniai hormonai, citrinos rūgštis, tioliai, įvairūs antioksidantai: tokoferolis, askorbo rūgštis, nikotino rūgštis, karotinoidai, flavonoidai: rutinas, kvercitinas);
- **fermentai** (katalazės, peroksidazės, glutationreduktazės, superoksiddismutazės ir kt.).

Visi šie veiksniai vertinami kaip **antimutagenai.**

Dirbtinės saugos priemonės nuo LR ir oksidacinio streso. Pirmiausia vartotinos gamtinės medžiagos, daug antioksidantų turintis maistas. Daugelis aukščiau suminėtų medžiagų yra antimutagenai ir prieš kitus mutagenus, alkilinančiąsias medžiagas (jas labai veiksmingai inaktyvina, pvz., tioliai), nitrozoaminus (minėtoji askorbo rūgštis), labai universalūs antimutagenai yra tokoferolis ir karotinoidai. Tad suprantamas jų priešvėžinis poveikis.

Ypatingoms situacijoms, padidėjusios rizikos žmonių grupėms (profesijoms) ieškoma itin veiksmingų sintetinių medžiagų antioksidantų. Tos ypatingos situacijos dažniausiai susijusios su darbu kariuomenėje, atominėje pramonėje, todėl apsauginės medžiagos yra valstybinė paslaptis. Sintetinant šias medžiagas, atsižvelgiama į naujas žinias apie LR. Pvz., suradus purino-pirimidino bazių laisvuosius

radikalus, pradėtos sintetinti **dvigubo veikimo medžiagos**. Jos turi ir antioksidantų (elektrono, t. y. ē-donorų) ir tiolių (H-donorų) savybių.

Šie junginiai yra LR gaudyklės, t. y. „sugaudo" ir trukdo •OH, O_2^-• bei kitiems LR sąveikauti su DNR ir kitomis ląstelės struktūromis, pvz., su membranomis. Dėl membranų pokyčio irgi gali pasireikšti **netiesioginis mutageninis LR gaminančių veiksnių mutageniškumas**.

Kai viršijama normali LR riba, pasireiškia oksidacinis stresas ir kaip atsakas į jį gali pradėti veikti trys genų grupės – regulonai *OxyR*, H_2O_2, *SoX*. Likviduojami ne tik LR, bet ir jų padarytos DNR pažaidos.

7.3.3. Biologiniai mutagenai. Topoizomerazinė ir insercinė (įterptinė) mutagenezė

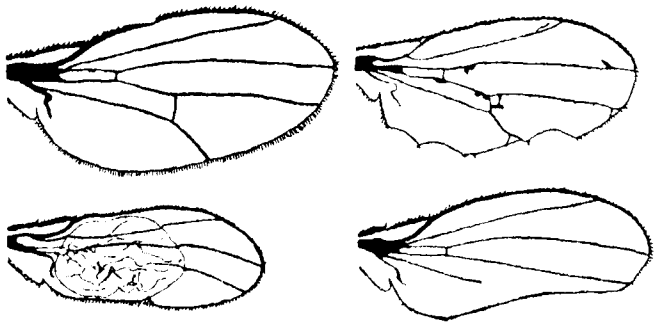
Automutagenai. M. Navašinas ir Peto (P. Peto) 1933 m. nepriklausomai vienas nuo kito pastebėjo, kad gamtinių mutacijų dažnis labai didėja sėkloms senstant. Vėliau buvo įrodyta, kad senose sėklose susidaro **automutagenai,** t. y. mutagenai, kurie sugeba indukuoti mutacijas tame pačiame organizme, kuriame jie atsiranda. Pavyzdžiui, kolchicinas normaliomis sąlygomis rudeniniam vėlyviui poliploidijos nesukelia. Vadinasi, jis nėra automutagenas. Tik Japonijos kalnų sąlygomis, esant dideliems temperatūros svyravimams, pakinta chromosomų skaičius ir rudeninio vėlyvio ląstelėse.

Pastaroji aplinkybė labai tipiška. Įvairūs organizmai gamina medžiagų, kurios yra nuodingos kitiems organizmams, bet pats gamintojas jiems atsparus. Tol, kol atsiranda veiksniai, dėl kurių sutrinka atsparumas savo paties nuodui. Jis gali sutrikti dėl dviejų priežasčių:

- mutacijų, įvykusių atsparumo genuose,
- ekologinių veiksnių, kaip rudeninio vėlyvio Japonijoje.

Svetimos (egzogeninės) DNR mutageniškumas. Insercinė mutagenezė. Dar 1938–1939 m., kai dar niekas iš genetikų nesidomėjo DNR (tada ji vadinta tymuso nukleorūgštimi), S. Geršenzonas įrodė, kad egzogeninė DNR yra gana stiprus mutagenas (7.9 pav.). Buvo atrastas labai svarbus biologinės mutagenezės tipas – **insercinė mutagenezė**. Įsiterpia svetimos (egzogeninės) arba savos, bet ne vietoje DNR sekos.

Egzogeninės DNR mutageniškumas gali būti trejopos kilmės:



7.9 pav. **Mutageninis DNR poveikis:**
drozofilos sparnų mutacijos (pagal S. Geršenzoną, 1939)

- laisvos DNR ir jos fragmentų, atsiradusių iš suirusių ląstelių,
- judriųjų genomo elementų,
- virusinės DNR fragmentų įsiterpimo.

Judrieji genomo elementai sukelia chromosomų trūkius ir trumpas duplikacijas įsiterpimo vietose. Svarbiausias yra pats įsiterpimas. Įsiterpus IS arba Tn, keičiasi geno arba gretimų genų veikla. Pokytį galima vertinti kaip mutaciją, ir tai vienas iš organizmo būdų valdyti mutagenezę. Tipiškiausias pavyzdys – įvairios alelinės mutacijos drozofilos *white* lokuse.

Virusų mutageniškumas yra viena iš mutacinių periodų priežasčių, kai labai padidėja, pvz., drozofilos, mutacijų dažnis. Šis reiškinys sutampa su virusinėmis epidemijomis.

Virusų mutageniškumas gali būti **ir netiesioginis** dėl jau nagrinėtų priežasčių:

- sukeldami uždegiminį procesą, virusai aktyvina neutrofilus, o šie gamina laisvuosius radikalus;
- slopinama DNR pažaidų reparacija.

Mutageniški gali būti mikroorganizmų veiklos produktai:

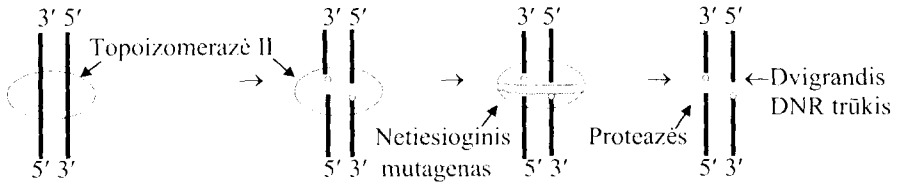
- dėl **bakterijų** genties ***Bacteroides*** veiklos susidaro **fekapentenai**;
- mutageniški gali būti **bakterijų ir grybų toksinai**, pvz., hemolizinio streptokoko nuodas streptolizinas-O, grybų *Fusarium* nuodai aflatoksinai, daugelis antibiotikų;
- mutacijas sukelia **mikoplazmos.**

Topoizomerazinė mutagenezė. Ji atrasta, ištyrus du reiškinius:

- laisvaradikalinę kai kurių antibiotikų mutagenezę;
- DNR trūkių, kurie atsiranda DNR paveikus proteazėmis, prigimtį.

Paaiškėjo, kad kai kurie antibiotikai (daunomicinas, adreamicinas ir kt.) sukelia **DNR trūkius netiesiogiai**, o sąveikaudami su fermentais **topoizomerazėmis**. Prisiminkime, kad tai savitos endonukleazės, kurios laikinai kerpa DNR, išsaugodamos „nepasimetusius" DNR galus. Paveikti antibiotikais šie fermentai taip pakinta, kad negali atsipalaiduoti nuo DNR. Tai mutageniška būsena.

Antra vertus, buvo aptiktas keistas reiškinys: DNR trūkiai gali atsirasti paveikus ne deoksiribonukleazėmis, o proteazėmis – fermentais, skaidančiais baltymus. Pasirodo, tai vietos, kuriose perkirptas DNR grandines sujungia topoizomerazės:



Jeigu trūkis dvigrandis, pakito topoizomerazės II veikla. Ši topoizomerazė kerpa abi DNR grandines. Dvigrandžius DNR trūkius sukelia ir topoizomerazės II inhibitoriai (nalidikso, oksolo rūgštys). Kai atsiranda vienagrandžiai DNR trūkiai, mutagenezė yra dėl topoizomerazės I pokyčių. Ši topoizomerazė kerpa tik vieną DNR grandinę. Vienagrandžius trūkius sukelia ir specifinis topoizomerazės I inhibitorius kamptotecinas. Įdomu tai, kad topoizomerazinę mutagenezę sukelia ir akridinai (pvz., 9-aminoakridinas), apie kuriuos manyta, kad jie yra tik interkaliaciniai mutagenai.

Tiesiogiai arba netiesiogiai mutacijos atsiranda ir dėl kitų fermentų, dalyvaujančių DNR sintezėje, reparacijoje ir rekombinacijoje.

Hormonai, antikūnai, stresas. J. Kerkis labai sistemingai, pradėdamas nuo hormonų mutageniškumo, įrodė, kad labai svarbus (gal ir svarbiausias) žinduolių spontaninės mutagenezės veiksnys yra stresas.

Jam būdingas hormonų pusiausvyros pokytis. Ypač genotoksiški steroidiniai hormonai. Jie ne tik sukelia DNR trūkius, bet yra ir teratogenai. J. Kerkis atrado ir kitokio tipo – **imuninio streso mutageniškumą**. Imuninis stresas atsiranda persodinant audinius, kai pasireiškia atmetimo reakcija. J. Kerkio bandyme tai stebėta persodinant odos gabalėlį pelėms. Imuninis stresas gali būti sietinas su **antikūnais** – su kita grupe biologinių mutagenų, kurių mutageniškumas įrodytas bandymais. Dar viena imuninio streso mutageniškumo priežastis labai reaktyvūs produktai, tarp jų laisvieji radikalai, kurie susidaro vykstant fagocitozei. Šie produktai gali susidaryti ir sąveikaujant su įvairiais ksenobiotikais – policikliniais arenais, **asbestu**. Šis yra labai kancerogeniškas ir nerekomenduotinas net stogams dengti.

7.3.4. Aplinkos mutagenai, jų įvertinimo problemos

7.3.4.1. Aplinkos mutagenų ypatybės ir genotoksiškumo įvertinimas

Gamtinės kilmės produktus keičia dirbtiniai, natūralią aplinką keičia dirbtinė aplinka. Neišvengiamai daugėja energijos šaltinių, auga cheminė pramonė. Vis daugiau cheminių medžiagų vartojama žemės ūkyje, žmogaus buityje. Suprantama, aplinkos tarša ir žalingas biologinis jos poveikis yra ne vien biologų ir medikų rūpestis. Šie klausimai tapo svarbia visos žmonių bendrijos ir kiekvienos šalies vyriausybių bei visuomenės veiklos dalimi.

Aplinkos mutagenai – tai tie mutagenai, kurie yra žmogaus ir kitų organizmų aplinkoje.

Apie daugelį aplinkos mutagenų jau rašyta ankstesniuose skyriuose. Aplinkos mutagenezė nagrinėjama atskirai dėl specifinių problemų, iš kurių svarbiausia **teisingas genotoksinio pavojaus įvertinimas**. Daug dėmesio skiriama pasitaikančioms vertinimo klaidoms.

Aplinkos mutagenų grupės. Pirmiausia skiriami **gamtiniai** aplinkos mutagenai. Dažniausiai mutacijas sukelia šių aplinkos veiksnių perteklius arba stoka. Pavyzdžiui, mutacijos atsiranda dėl azoto bado

ir dėl pertekliaus. Gamtinėmis sąlygomis pasireiškia silpni mutagenai: įvairūs metabolitai, susikaupę organizme neįprastais kiekiais, jų dariniai. Bet organizmus veikia ir stiprūs mutagenai, tokie kaip jonizuojančioji spinduliuotė, tik silpnos dozės. Tai natūralus spinduliuotės fonas. Jo dydis 0,3–0,6 milizyverto per metus.

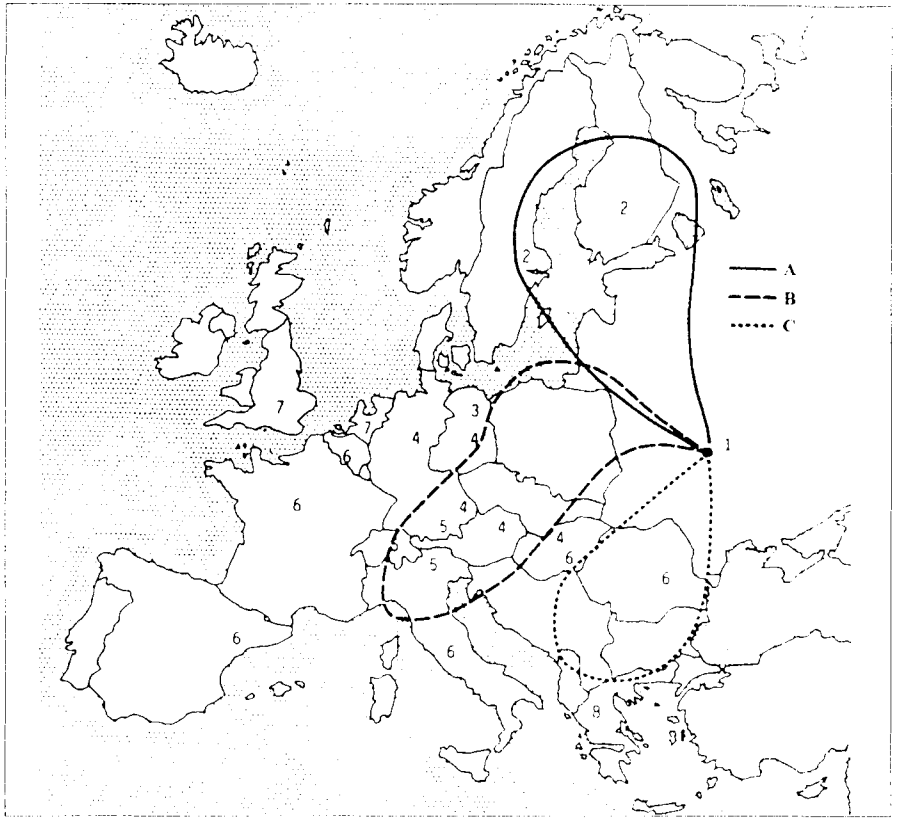
Kita aplinkos mutagenų grupė yra **dirbtiniai**, nebūdingi organizmui **ksenobiotikai**, nenatūralios kilmės vaistai, įvairūs pesticidai ir kt.

Aplinkos mutagenai dar skirstomi į **globalinius** ir **lokalinius**. Su lokaliniais mutagenais susiduria pavieniai individai arba populiacijos. Globaliniai mutagenai patenka į orą arba į vandenis, todėl gali pasklisti po visą Žemės rutulį. Pavyzdžiui, išbandžius atominį ginklą atmosferoje, radioaktyvusis lietus iškrisdavo už tūkstančių kilometrų nuo sprogdinimo vietos. Antai po Kinijos vykdytų atominių bombų bandymų atmosferoje radioaktyvusis lietus yra iškritęs Lenkijoje. Černobylio AE katastrofa rodo, kad stambių pramonės objektų keliamas genotoksikologinis pavojus nėra tik vienos šalies rūpestis. Iš Černobylio radioaktyvios oro masės atkeliavo į Skandinaviją, Lietuvą, ypač jos pietvakarius. Nukentėjo Baltarusija, gan didelė Rusijos sritis (7.10 pav.)

Aplinkos mutagenų ypatumai. Pirmiausia iškyla **slenkstinės dozės** klausimas, kuris daugumai aplinkos mutagenų yra neišspręstas. Pažymėtina, kad daugelio cheminių mutagenų mažos dozės ne slopina, o **stimuliuoja** organizmą. Ar šios stimuliuojančios dozės yra mutageniškos, neaišku. Dar sunkiau apie slenkstinę dozę spręsti tokių gamtinių aplinkos mutagenų, kurie paprastai yra būtini organizmui. Antra vertus, kai kurie organizmai gali prisitaikyti ir prie itin didelių mutagenų dozių.

Be to, organizmai gali aktyviai kaupti įvairius mutageninius junginius, nors aplinkoje jų ir būtų palyginti mažos koncentracijos. 7.11 paveiksle pavaizduota, kaip kaupiasi vandenyje gyvenančiuose organizmuose pesticidas DDT – (2,2-bis(parachlorfenil)-1,1,1-trichloretanas). Tyrimai atlikti viename iš Kalifornijos (JAV) ežerų, kur DDT naudotas uodams naikinti. Vandens telkinyje jo buvo tik 0,00005 mg/kg, o vandens gyvūnai ir augalai jo sukaupė labai daug, iki 75,5 mg/kg (pvz., *Larus delavarensis*). Panašius rezultatus gavo R. Lekevičius ir S. Sinkevičius Lietuvoje.

Organizme kaupiasi tie aplinkos mutagenai, kurie organizmo neperdirbami į nekenksmingus, nemutageninius junginius arba perdirbami labai lėtai.

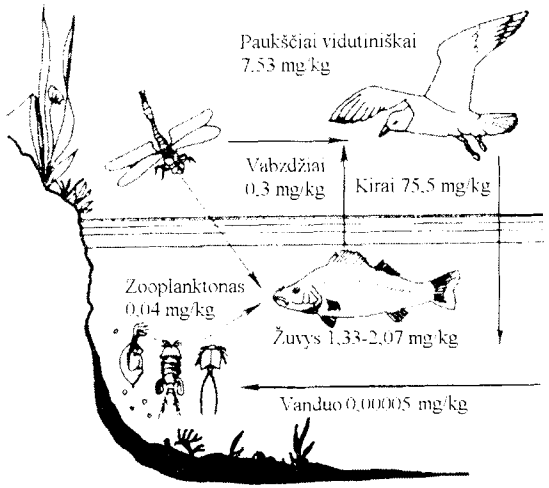


7.10 pav. **Oro masių judėjimas nuo Černobylio:**
A – 1986 m. balandžio mėn. 26 d.; *B* – balandžio 27–28 d.; *C* – balandžio 29–30 d.; (pagal UNSCEAR, 1998)

Genotoksinis pavojus viešai pripažįstamas tų veiksnių, kurie bent padvigubina mutacijų dažnį, palyginti su gamtiniu mutacijų lygiu. Dvigubinanti dozė yra sutartinė, pagrįsta statistikos dėsniais.

Manoma, kad dvigubai padidėjęs mutacijų dažnis yra jau pakankamai patikimas, nors tai priklauso ir nuo **n** (ištirtų individų skaičiaus).

Ši taisyklė galioja nustatant ir žinomo mutageno (dėl kurio mutageniškumo neabejojama) slenkstinę dozę. Antai **jonizuojančiosios spinduliuotės dvigubinančioji** doze laikoma **1 Sv**. Pasak Nylo (J. V. Neel) ir Levio (S. E. Lewis), **galingos** spinduliuotės dvigubinanti dozė yra **1,35 Sv**, **chroniškos** spinduliuotės – apie **4 Sv**.



7.11 pav. **DDT kaupimasis mitybinės grandinės organizmuose:** kirai (*Larus delavarensis*) (pagal R. Lekevičių, 1983)

Genotoksikologinis „kokteilio" įvertinimas. Aplinkoje veikia ne vienas veiksnys, o jų kompleksas. Vyksta įvairios sąveikos, dėl kurių susidaro nauji mutageniški produktai arba vieni veiksniai neutralizuoja kitų veiksnių mutageniškumą. Viena, išbandyti genotoksinį, pvz., gryno ir vieno dimetilnitrozoamino poveikį eksperimentiniams gyvuliukams ar žmogaus ląstelėms, ir visai kas kita to paties nitrozoamino poveikį tirti gamtinėmis sąlygomis, kur veikia ne tik šis mutagenas.

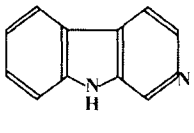
Dviejų veiksnių sąveika gali būti keturių tipų:
– **adityvi, sinerginė, komutageninė, antimutageninė.**

Adityvi sąveika yra tada, kai bendras dviejų mutagenų poveikis lygus atskirai paimtų veiksnių mutageninių poveikių sumai.

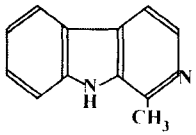
Sinerginė sąveika vyksta tada, kai dviejų mutagenų bendras poveikis didesnis už tų pačių mutagenų, tik išbandytų atskirai, mutageninių poveikių sumą. Pvz., labai daug ginčų kyla dėl etanolio (etilo alkoholio). Šiuo metu sutariama, kad normaliomis sąlygomis jis yra nemutageniškas arba labai silpnas mutagenas. Bet paveikus augalus etanoliu kartu su EDTA (etilendinitriltetraacetatu), kuris vartojamas, pvz., kaip priešnuodis apsinuodijus švinu, bendras etanolio ir EDTA poveikis buvo 10 ir daugiau kartų didesnis už mutageninį poveikį, kuris gaunamas susumavus šių atskirai išbandytų dviejų medžiagų, mutageninį poveikį.

Sensibilizuojančioji sąveika yra tada, kai nuo kokio nors nemutageninio veiksnio organizmas pasidaro jautrus kuriam nors mutagenui, ir šio mutageno mutageninis veikimas gerokai padidėja. Pavyzdžiui, kepant mėsą (ypač jai apdegus), iš aminorūgšties triptofano susidaro įvairūs mutageniniški derivatai ir **norharmanas bei harmanas.** Šie nėra mutagenai, bet padidina kitų junginių mutageniškumą keletą kartų.

Asmenys, kurie daug rūko, yra jautresni daugeliui tirtų mutagenų. Rūkant irgi susidaro norharmanas ir kitas sensibilizatorius harmanas:



Norharmanas
(9H-pirido (3,4-b) indolas)



Harmanas
(1-metil-9H-pirido (3,4-b) indolas)

Komutageninė sąveika vyksta tada, kai du atskirai išbandyti veiksniai yra nemutageniški, o kartu jie – mutageniški, pvz., bakterijas *Salmonella* paveikus vienu metu litocholio rūgštimi (viena iš tulžies rūgščių) ir 2-aminoantracenu.

Antimutageninė sąveika. Novikas (A. Novick) ir Scilardas (L. Scilard) 1949 m. atrado **antimutagenus**, slopinančius mutagenų veikimą. Visiškai išvengti aplinkos mutagenų neįmanoma, todėl svarbu maksimaliai sumažinti žalingą jų poveikį genotipui. Šiam tikslui vartojami antimutagenai glutationas ir kiti tioliai, antioksidantai.

Kompleksinis aplinkos veiksnių poveikis. Aplinkos veiksnių mutageniškumas priklauso nuo kompleksinio kitų aplinkos veiksnių poveikio, todėl jį svarbu tirti kokrečiomis sąlygomis. Būtina maksimaliai laikytis **„visų kitų lygių"** principo, t. y. visomis kitomis sąlygomis bandymas ir kontrolė neturi skirtis.

Tai padaryti nelengva. Pvz., kaip nustatyti, koks šiluminės elektrinės genotoksinis poveikis. Galima tirti kurio nors organizmo mutacijų dažnį priklausomai nuo atstumo, bet tyrimui neįmanoma vietų parinkti taip, kad jų ekologinės sąlygos nesiskirtų. Vienur bus arti kelias, kitur – ežeras ar upė, o dar kitur – galbūt miškas ir panašiai.

Objekto „istorija" kaip genotoksinio vertinimo klaidų šaltinis. „Istorija"– tai organizmą arba organizmų grupę (pvz., populiaciją) iki tol veikusi aplinka. Lyginamų formų ir kitų taksonų ji turėtų būti vienoda. Tai irgi sunkiai pasiekiama. Stengiamasi sukurti **„nulinį variantą"**. Antai siekiant nustatyti, kokią įtaką aplinkai daro Ignalinos AE, prieš ją

statant buvo atlikti įvairiausi tyrimai, tarp jų, R. Lekevičiui vadovaujant įvertintas mutacijų dažnis. Tyrimai periodiškai kartojami ir lyginami. Tačiau keičiasi meteorologinės sąlygos, rezultatus gali sąlygoti padidėjusi šio krašto urbanizacija ir kiti veiksniai.

Kai kuriose šalyse buvo bandoma įvertinti stambesnių žmonių populiacijų „nulinę" padėtį, pvz., kokią įtaką daro pramoninė tarša. Dažniausiai buvo pasirenkami visiškai nauji miestai, iškilę pastačius stambius pramonės objektus. Rusijoje buvo pasirinktas Angarskas. Tačiau vėlgi daugelis suvažiavusiųjų į šį miestą tęsė savo buvusią profesinę veiklą arba, ne paslaptis, priklausė asocialioms žmonių grupėms. Be to, vieni buvo gimę ir augę Sibire, o kiti suvažiavo iš visiškai kitokio klimato vietovių. Tad vėlgi buvo „istorinis šleifas".

Genotoksikologinių tyrimų rezultatai priklauso nuo genotipo/organizmo, amžiaus, lyties, patikimo ir įvairiapusiško vertinimo metodų.

Priklausomybė nuo lyties. Pirmiausia pasireiškia gametogenezės skirtumai. Apšvitinus pelių patinėlius 2–4 Gy jonizuojančiosios spinduliuotės dozėmis, po 2–3 mėnesių visiškai atsistatė jų vaisingumas. Patelės ir po mažesnės, 0,5 Gy, dozės visam laikui tapo nevaisingomis.

Priklausomybė nuo amžiaus. Senatvė – vienas iš mutageniškiausių organizmo pokyčių. **Sutrinka visa genetinės medžiagos saugos sistema**. Padidėjęs aneuploidų arba vėžio dažnis – šio reiškinio atspindys. Senstant keičiasi citochromų P-450 spektras, sutrinka ksenobiotikų biodegradacijos bei šalinimo sistema, išsiderina laisvųjų radikalų-antioksidantų pusiausvyra – kaupiasi mutagenai, mažėja daugelio fermentų, svarbių genetinių struktūrų stabilumui palaikyti, DNR sintezės ir reparacijos fermentų ir kt. aktyvumas, sutrinka ląstelės ciklo valdymas ir kt.

Patikimas ir įvairiapusiškas genotoksiškumo įvertinimas. Jau buvo rašyta, kad kai kurie mutagenai sukelia tik vieno tipo mutacijas, pvz., kolchicinas – poliploidiją.

Pirmiausias uždavinys yra visapusiškai įvertinti veiksnį arba veiksnių „kokteilį". Būtina nustatyti mutageninį, rekombinogeninį ir teratogeninį poveikį, be to, mutageninį diferencijuotai pagal mutacijų tipus: genomo, chromosomų, genų. Skirtumai pasireiškia net tarp to paties organizmo skirtingai diferencijuotų ląstelių, audinių.

Anksčiau labai pasikliauta Eimso *Salmonella typhimurium* metodu. Tačiau šiuo metodu nustatomos tik genų mutacijos. Be to, genotoksiškumas labai priklauso nuo organizmų, todėl automatiškai taikyti šio metodo rezultatus žmogui ar kitiems žinduoliams yra nekorektiška.

Salmonella, Escherichia bandiniai genotoksikologų vertinami todėl, kad per trumpą laiką suteikia pirminių žinių apie galimą genotoksiškumą. Vis dėlto pastaruoju metu labiau vertinami **chromosomų aberacijų** tyrimai žmogaus limfocituose arba įvairiose eksperimentinių gyvuliukų ląstelėse, ląstelių linijose. Pastarosiose galima tirti ir **genų mutacijas**. Tos pačios ląstelės raidoje jautrumas mutagenui irgi kinta. Tai labai smulkiai nustatyta žinduolių lytinėms ląstelėms.

7.3.4.2. Naujų mutacijų aptikimo metodai

Naujų mutacijų problema kilo dar pačioje indukuotos mutagenezės pradžioje. Reikėjo patikimai įrodyti, kad iš tiesų atsirado naujos mutacijos, o ne išryškėjo slypintys mutantiniai genai (tai visiškai reali galimybė).

Mioleris išsprendė šią problemą pasiūlydamas naują įtikinantį metodą drozofilos letalioms „sukibusioms" su lytimi recesyviosioms mutacijoms aptikti. Jis įrodė, kad jonizuojančioji spinduliuotė tikrai sukelia šio tipo mutacijas. Pagal genetinius žymeklius, kuriuos turi tyrimams naudojama drozofilos linija, šis metodas vadinamas ***ClB.***

ClB metodu aptinkamos naujos recesyviosios „sukibusios" su lytimi letalios mutacijos.

***ClB* metodas**. tyrimams naudojama specialiai sukurta linija. Vienoje jos patelių X chromosomoje yra:

- **inversija C**; ji trukdo vykti krosingoveriui, kuris gali iškreipti tyrimų rezultatus;
- **letali recesyvioji**, „sukibusi" su lytimi **mutacija *l***; ji gali pasireikšti tik patinėliuose, kurie turi tik vieną X chromosomą (genas būtų hemizigotinėje būklėje) arba patelėse, jeigu jos homozigotinės, ir abiejuose jų X chromosomose yra tas pat letalus genas;
- **pusiau dominuojančioji mutacija *Bar***. Ji yra genetinis žymeklis. Visos drozofilų patelės, kurios paveldi šią *ClB* chromosomą, yra siauresnėmis akimis, nes dominuojantysis genas pasireiškia heterozigotose.

Patinėliai paveikiami mutagenu (pvz., apšvitinami jonizuojančiais spinduliais). Naujos recesyviosios letalios mutacijos įvyksta ne visų tiriamųjų patinėlių X chromosomose.

Kai **patinėlių X chromosomoje naujų recesyviųjų letalių mutacijų neatsiranda,** sukryžminus *ClB* linijos pateles (*ClB* || +) su normaliais, bet paveiktais mutagenu patinėliais, lyčių santykį F_1 gautume ♀2 : ♂1: **visos patelės gyvybingos** ir tos, kurios turi *l* geną, nes jį stelbia normalus dominuojantysis genas. Patinėliai, kurie paveldi iš motinos *ClB* chromosomą, žus.

Naujos mutacijos aptinkamos F_2. Šiam tikslui iš F_1 išrenkamos visos ***ClB* patelės ir kryžminamos su normaliu, be jokių poveikių patinėliu**. *ClB* patelės pažįstamos iš „siaurų" akių *Bar*. Kai naujų mutacijų nėra, žūva tik tie patinėliai, kurie iš motinos paveldėjo *ClB* chromosomą (ir kryžminimų rezultatas toks pat, kaip ir F_1:

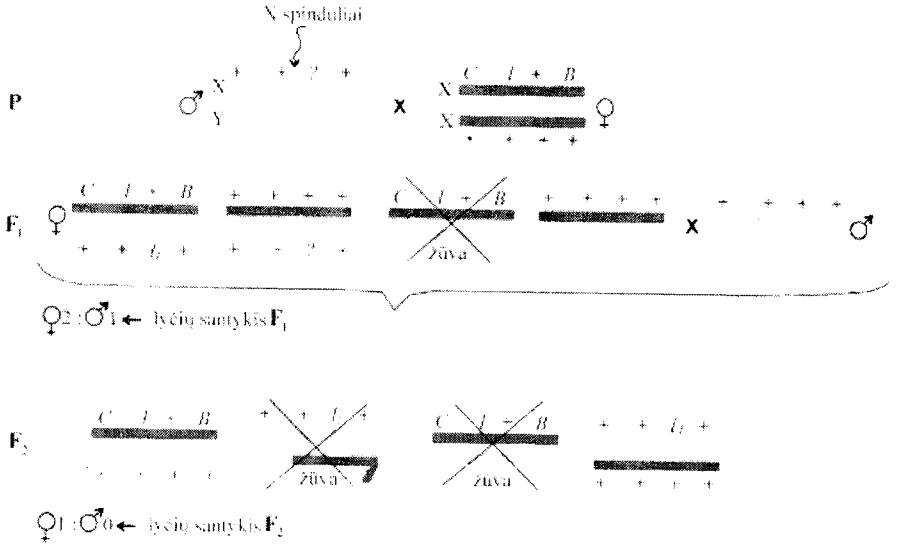
♀2 : ♂1.

Nauja letali mutacija patinėlio X chromosomoje. Pataikius sukryžminti *ClB* pateles su patinėliu, kurio X chromosomoje po poveikio mutagenu atsirado nauja letali recesyvioji mutacija, F_1 skirtumo nepastebėtume. Vėl F_1 lyčių santykis būtų ♀2 : ♂1. Žūtų visi patinėliai, iš motinos paveldėję *ClB* chromosomą. Patinėliai, paveldėję iš motinos normalią X chromosomą (+), būtų gyvybingi. ***ClB* patelės gyvybingos**, nors jų ir antroje X chromosomoje yra naujas letalus genas l_1, bet jis nealelinis *l*. (7.12 pav., F_1). Šios ClB patelės vėl kryžminamos F_2 hibridams gauti su normaliais patinėliais, nepaveiktais mutagenu.

Šįsyk rezultatas kitoks: F_2 visi patinėliai žūva, lieka tik patelės (7.12 pav.). Vieni patinėliai žuvo, kad paveldėjo *ClB* chromosomą, o kiti, – kad paveldėjo X chromosomą su nauja letalia mutacija l_1. Tereikia suskaičiuoti, kiek F_2 yra mėgintuvėlių, kuriuose yra patinėliai, ir kuriuose jų visai nėra, ir sužinosime naujų mutacijų dažnį.

Atspaudų metodas. Selektyvios terpės. 1952 m. Lederbergai (J. Lederberg, E. M. Lederberg) sugalvojo labai paprastą, bet patikimą būdą naujoms bakterijų mutacijoms aptikti ir išsprendė užsitęsusį genetikų ginčą dėl mikroorganizmų prisitaikymo prie antibiotikų. Mat pradėjus naudoti antibiotikus, bakterijos labai greitai įgyja atsparumą. Susikirto dvi nuomonės:

- lamarkinė, kad tai kryptingas pokytis,
- kita: mutantiniai genai yra bakterijų populiacijoje. Antibiotikas tik atrenka atspariąsias ir jautriąsias ląsteles.

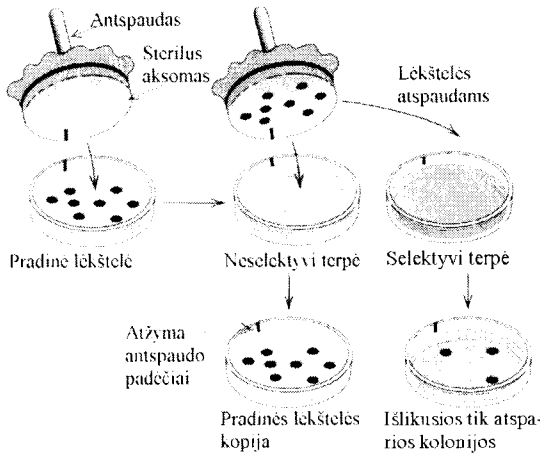


7.12 pav. ***ClB* metodas naujoms „sukibusioms" su lytimi recesyviosioms letalioms drozofilos mutacijoms aptikti:**
P – apšvitintoje X chromosomoje genas gali nepakisti (+) arba įvykti nauja letali mutacija l_1, bet kitame chromosomos lokuse. Šios l_1 mutacijos padėtis nesutampa su *l* geno vieta ClB chromosomoje. Tad F_1 gali būti keturių genotipų patelės: *C l* + +*B*/+ + + +, *C l*+ + *B*/+ + l_1 +, + + + +/+ + + + ir + + + +/+ + l_1 +. Visos jos gyvybingos, bet atrenkamos ir toliau tiriamos tik *ClB* patelės. Jos kryžminamos su normaliais be jokių poveikių patinėliais + + + + / *Y*. F_2 *C l* + +*B* / + + + + palikuonių lyčių santykis kaip ir F_1 – 2:1. Paveiksle pavaizduoti rezultatai, kurie gaunami sukryžminus *C l* + *B*/+ + l_1 + pateles su normaliais patinėliais: F_2 visi patinėliai žūva, išlieka tik patelės (1:0). F_2 kiekvienos *ClB* patelės palikuonys auginami atskirame mėgintuvėlyje, todėl naujų mutacijų dažnis nustatomas palyginus visų ištirtų mėgintuvėlių skaičių su mėgintuvėlių, kuriuose F_2 yra tik patelės, skaičiumi

Dabar jau žinome, kad ir bakterijų atsparumas nuodams – sudėtingas požymis. Tuo metu genetikai „išgelbėti" nuo lamarkizmo pakako to, kad tarp bakterijų aptikta tokių, kurios iš tiesų jau buvo atsparios tiriamam antibiotikui prieš jį panaudojant.

Atspaudų metodo esmė. Prie kietos agaro terpės, kurios paviršiuje auga bakterijų kolonijos, priglaudžiamas „antspaudas". Tai į Petri lėkštelę telpantis volelis, aptrauktas aksomu (viskas atliekama steriliai).

Ant aksomo plaukelių pakimba bakterijos. Jų padėtis tiksliai atitinka kolonijų išsidėstymą pradinėje lėkštelėje. „Antspaudas" priglaudžiamas prie kitos Petri lėkštelės agaro terpės paviršiaus. Po



7.13 pav. **Atspaudų metodas ir jo panaudojimas atsparių nuodui ląstelių kolonijoms atrinkti**

inkubacijos antroji Petri lėkštelė yra pirmosios lėkštelės kopija: bakterijų kolonijos tiksliai atitinka jų išsidėstymą pradinėje lėkštelėje (7.13 pav.).

Jeigu iš pradžių bakterijos buvo auginamos terpėje be jokių priedų, o atspaudas darytas ant terpės, į kurią įdėta, pvz., mirtinos streptomicino dozės, tai tokioje lėkštelėje išauga tik tos kolonijos, kurios atsparios streptomicinui. Terpė su streptomicino priedu yra **selektyvi**, todėl galima atrinkti atsparius streptomicinui mutantus – tiek buvusius bakterijų populiacijoje, tiek ir atsiradusius po poveikio mutagenu.

Kai norima aptikti **biochemines mutacijas**, daromos dvi kopijos nuo pradinės bakterijų Petri lėkštelės:

- viena jų auginama terpėje su ta medžiaga, kurios nesintetinantys mutantai atrenkami;
- kitoje lėkštelėje yra vadinamoji **minimali**, be jokių papildomų priedų terpė. Joje biocheminis mutantas neauga.

Palyginus abi Petri lėkšteles, nustatomos mutantinės kolonijos. Tos, kurios ant selektyvios terpės auga, o ant minimalios ne, yra biocheminiai mutantai. Atspaudų metodas gali būti taikomas ir eukariotų ląstelėms.

Promutagenų aptikimo metodai. „Šeimininko-tarpininko" bandinys (angl. *host-mediated assay*) – tai pirmasis metodas promutagenams aptikti. Jį dar 1969 m. pasiūlė Geimbridžas (M. G. Gambridge) ir Legatorius (M. S. Legator). Į eksperimentinių gyvuliukų pilvo ertmę buvo įšvirkšta *E. coli* ląstelių suspensija. Prieš tai gyvuliukams buvo įvairiais būdais duodama kokio nors tiriamojo junginio (ksenobiotiko). Jeigu junginys bakterijoms tiesiogiai mutacijų nesukėlė, o paauginus „šeimininke-tarpininke" padidėjo bakterijų mutacijų dažnis, daroma išvada, kad žinduolių organizme susidaro mutageniški junginio metabolitai. Šis junginys yra **promutagenas**.

Eimso *Salmonella typhimurium* sistema promutagenams ir tiesioginiams mutagenams aptikti. 1973 m. Eimsas ir jo bendradarbiai pasiūlė metodą mutagenams, tarp jų ir promutagenams aptikti. Jis daugiau kaip 20 metų buvo populiariausias mutageniškumui tirti.

Šioje sistemoje svarbūs du dalykai:

- būdas promutagenams aptikti,
- patys *Salmonella* kamienai, jų galimybės mutageniškumui tirti.

Promutagenai nustatomi panašiai kaip „šeimininko-tarpininko" bandiniu. Junginio mutageniškumas išbandomas **tiesiogiai ir po inkubacijos su S-9 frakcija**. Ši frakcija gaunama centrifuguojant 9000 g susmulkintas (homogenizuotas) kepenis. Labai aktyvi frakcija yra iš graužikų kepenų, nes šie labai atsparūs įvairiems ksenobiotikams.

Inkubacija su S-9 frakcija, arba kitaip vadinama mikrosomų frakcija, parodo, ar po tiriamojo ksenobiotiko biodegradacijos I fazės susidaro mutageniški metabolitai. Mat S-9 frakcija – tai homogenizuojant suskaidytos membranos, kuriose yra aktyvūs I fazės fermentai – citochromai P-450, peroksidazės. Kad frakcija būtų aktyvesnė, graužikai kurį laiką veikiami citochromų P-450 induktoriais.

Gali būti tiriamas ir ksenobiotikų biodegradacijos II fazės fermentų poveikis. Tada gaunama citozolio, kuriame yra dauguma šių fermentų, frakcija. Atitinkamai vadinama S-100 arba S-110 (žiūrint koks g).

***Salmonella* kamienai**. Jie vertingi ir tiesioginiams mutagenams tirti. Iš rezultatų galima nustatyti, kokio tipo mutacijas sukelia junginys:

- **nukleotidų pakaitas** – atsiranda kamienų **T100**, TA1535 ir kt. mutacijos;
- **skaitymo rėmelio poslinkio** – atsiranda kamienų **TA98**, TA1538 ir kt. mutacijos.

Vėliau buvo sukonstruoti **specialūs kamienai**, kuriais galima nustatyti, **kokie mutagenai** yra susidarę audinių ekstrakte, kraujo serume ir pan.:

- TA102, TA104 – **laisvaradikalinei mutagenezei** aptikti;
- TA98/1,8-DNP6 – **nitrozoaminų** mutageniškumui nustatyti ir kt.

Japonų mokslininkai sukonstravo dirbtines daugiakopijines plazmides ir sukūrė *Salmonella* kamienus, kurie yra 500 kartų mutabilesni nitroarenams, nitrozoaminams, negu TA kamienai.

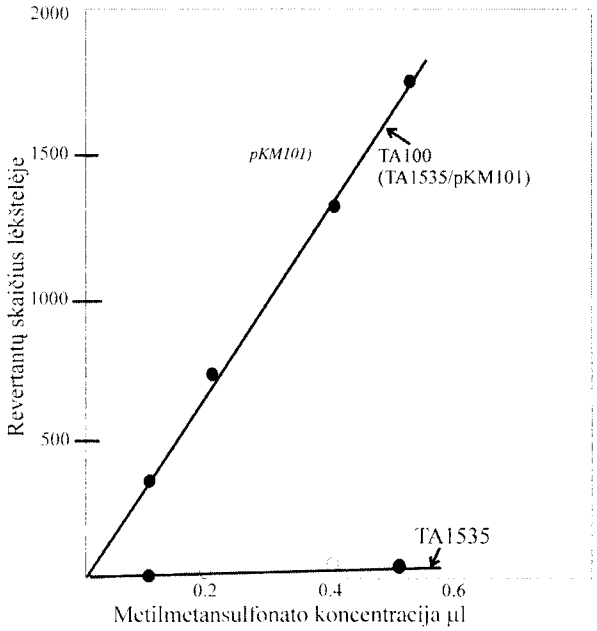
Nepaprastas kamienų mutabilumas – didelis jų privalumas. Kamienai sukonstruoti taip, kad būtų pašalintos visos galimos kliūtys mutageniškumui pasireikšti (7.2 lentelė), netrukdo rekombinacija, nepralaidumas, DNR reparacija.

Bet apie vieną veiksnį plačiau. Eimsui ir jo bendradarbiams pasisekė: jie aptiko du kamienus TA98 ir TA100, kurie yra **ypač mutabilūs** (7.14 pav.). Šio mutabilumo priežastis paaiškėjo vėliau: šiuose kamienuose papildomai yra **plazmidė *pKM101***. Ši plazmidė turi mažytį dviejų genų operoną – *umuDC* analogą. Operonas lemia mutagenišką DNR reparaciją. Neištaisomos klaidos vykstant DNR sintezei ir reparacijai. Vadinasi, TA100 ir TA98 kamienais lengviau aptikti silpnų mutagenų poveikį.

7.2 lentelė. **Kai kurie *Salmonella typhimurium* kamienai cheminių junginių mutageniškumui įvertinti** (pagal B. N. Ames et al., 1975 su papildymais)

Visų kamienų bendras protėvis LT2				
histidino mutantai, kuriuose indukuojamos *his* →*his*⁺ reversijos		papildomos mutacijos ir genetinės struktūros		
his G46→*his*⁺ aptinkamos bazių pakaitos	*his D3052*→*his*⁺ aptinkamos rėmelio poslinkio mutacijos	delecijos	atsparumas R veiksniui	plazmidė *pKM101*
↓ TA 1950	↓ TA 1534	*chl bio uvrB*	—	—
↓ TA 1530	↓ TA 1964	*gal chl bio uvrB*	—	—
↓ TA 1535	↓ TA 1538	*gal chl bio uvrB rfa*	—	—?
↓ **TA 100**	↓ **TA 98**	*gal chl bio uvrB rfa*	+R	+

Rodyklėmis parodyta kamienų konstravimo eiga. Kamienų ypatybės: R – lytinis veiksnys, lemia rekombinaciją; *+R* – ląstelės, atsparios R, rekombinacija slopinama; plazmidė *pKM101* turi genų *umu D, C* analogus, kurie lemia mutagenišką DNR reparaciją, todėl kamienai su šia plazmide yra ypatingai mutabilūs. Genai *rfa*⁻ (*deep rough*) – padidėjęs pralaidumas, nes nėra polisacharidinės kapsulės; *uvrB*⁻ – slopinama DNR pažaidų reparacija; *chl*⁻, *gal*⁻, *bio*⁻ – praverčia, kai reikia kontroliuoti kamienų grynumą; pačios delecijos su tiek genų yra nerevertuojamos.



7.14 pav. ***Salmonella thyphimurium* kamienų mutabilumas priklausomai nuo plazmidės *pKM101***

Dar vienas visų *Salmonella* TA kamienų privalumas: visi jie kilę iš vieno bendro kamieno, todėl galima išvengti mutagenezės priklausomybės nuo konteksto (žr. toliau).

Naujų mutacijų aptikimo metodai žinduolių, žmogaus ląstelėse. *Salmonella* ir žinduoliai – per daug didelis skirtumas, kad būtų galima taikyti bakterijų tyrimo rezultatus žmogui. Šiuo metu genų inžinerijos metodais konstruojamos specialios eksperimentinių gyvuliukų, žmogaus ląstelių linijos, kurios savo savybėmis panašios į *Salmonella* kamienus. Antai žmogaus limfocitų linijai AHH1 būdingas labai aukštas oksidacinis potencialas: didelis hidroksilazinis, oksidazinis ir peroksidazinis aktyvumai. Ji yra TA102 ir TA104 analogas.

Labai geras genotoksinės būsenos rodiklis gali būti vėžys.
Tačiau žinotini trys dalykai:

- **vėžiui pasireikšti gali būti labai ilgas paslėptas (latentinis) laikotarpis**, ypač standžiajam (10–40 metų). Chroniškai granulocitozinei leukemijai šis laikotarpis sutrumpėja iki 4 metų;
- **keičiasi vėžio diagnostikos-registracijos tikslumas ir metodai**. Tai „pablogina“ dabartį, palyginti su praeitimi;

- **eksperimentinių tyrimų rezultatai labai priklauso nuo objekto**. Net labai artimų objektų genotoksikologinis vertinimas pagal šį rodiklį gali nesutapti. Antai tik 45% chloruotų junginių, sukeliančių vėžį pelėms, sukelia jį ir žiurkėms.

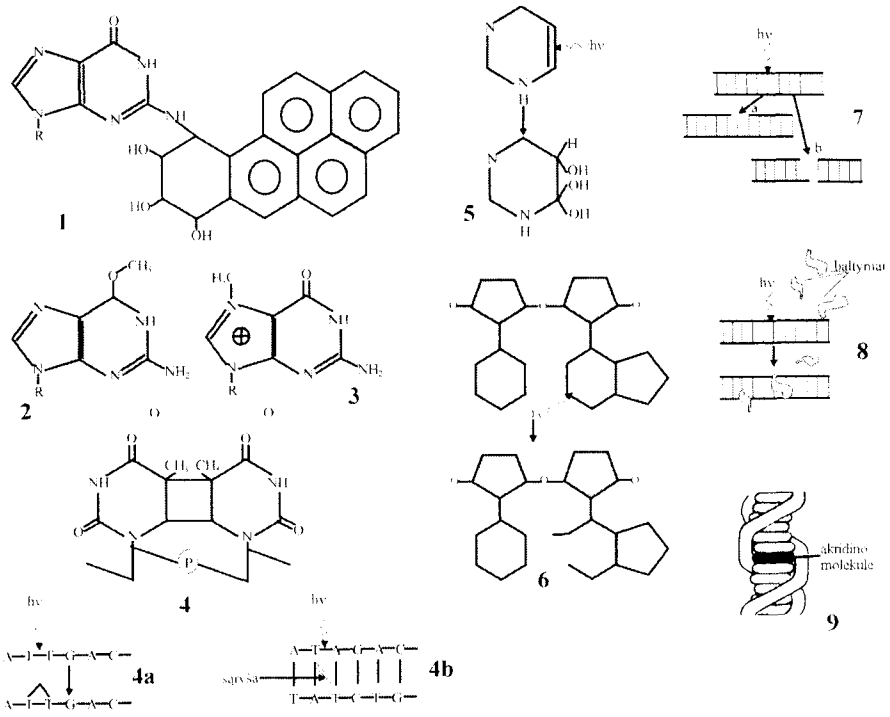
Naujų mutacijų dažnis populiacijoje. Nustatyti naujų mutacijų dažnį populiacijoje, ypač žmogaus, labai svarbu, bet sudėtinga. Pirmiausia labai dažnai painiojamos sąvokos ir reiškiniai. Antai fenilketonurijos geno mutacijų dažnis visiškai nereiškia, kad atsirado naujos mutacijos, tik nurodo mutantinio alelio dažnį.

Antra, kyla problemų, kurių nėra, kai bandymai atliekami su eksperimentiniais objektais ir kontroliuojamomis sąlygomis. Viena jų – kintanti paveldimų ligų registracija, jos klaidos. Todėl lyginant įvairių tarpsnių rezultatus, labai svarbu išsaugoti tą pačią paveldimų ligų registracijos metodiką. Labai sunku taikyti „visų kitų lygių" principą.

7.4. Mutagenų pradinio veikimo mechanizmai. Potencialios DNR pažaidos

DNR pažaidų tipai. Tiesioginis mutageno poveikis pasireiškia per jo sąveiką su genetine medžiaga – DNR arba RNR. Šios sąveikos rezultatas yra DNR (arba atitinkamai RNR) pažaidos. Jų yra įvairių (7.15 pav.):

- **atskirų nukleotidų**, tarp jų **aduktai**, kurie atsiranda susijungus mutagenui su purino arba pirimidino baze kovalentiniu ryšiu; gali pakisti bazių sandara nuo nedidelių pokyčių (pvz., deaminavimo) iki visiško suirimo;
- **AP saitai** (taip nediferencijuotai šiuo metu vadinamos šios pažaidos). Tai DNR molekulės vietos, kuriose iškritusi purino (**apurininis** saitas) arba pirimidino (**apirimidininis** saitas) bazė;
- **pirimidino bazių dimerai** – tai specifinės DNR pažaidos, kurias sukelia UV spinduliai (žr. 7.6 pav.); dvi pirimidino bazės sujungtos kovalentine jungtimi;
- **įvairių tipų sąryšos**:
  - **dviejų bazių sąryšos** – surišamos viena šalia kitos bazės toje pačioje grandinėje (**vidugrandinės sąryšos**);
  - **tarpgrandinės sąryšos** – surišamos dvi DNR grandinės;
  - **DNR – DNR sąryšos** – surišamos dvi DNR molekulės;
  - **DNR – RNR sąryšos** – surišama DNR su RNR;
  - **DNR – baltymo sąryšos** – DNR surišama su baltymu;



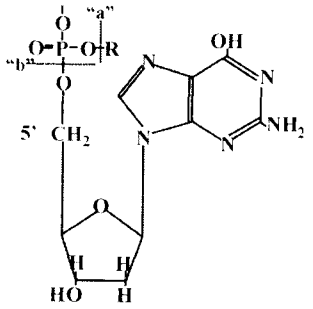
7.15 pav. **Įvairūs DNR pažaidų tipai:**
nukleotidų pažaidos: *1–3* – aduktai (*1* – benz(a)pireno-guaninas; *2* – O^6-metilguaninas; *3* – N7-metilguaninas); *4* – timino dimeras; *5* – timino arba citozino hidratai; *6* – bazių destrukcija (susidaro AP-saitai); *7* – DNR trūkiai (*a* – vienagrandis; *b* – dvigrandis); *4a, 4b, 8* – sąryšos (*4a* – toje pačioje grandinėje tarp nukleotidų; *4b* – tarpgrandinės sąryšos; *8* – DNR-baltymo sąryšos); *9* – interkaliacija, įsiterpia mutageno (pvz., akridino molekulė) tarp dviejų nukleotidų, dėl jos atsiranda rėmelio poslinkio mutacijos – iškrinta arba įsiterpia nukleotidų pora, nukleotidai chemiškai nemodifikuojami (pagal V. Soiferį, 1969, su papildymais)

- **vienagrandžiai ir dvigrandžiai DNR trūkiai**, nors ir skirstomi į pirminius, atsiradusius dėl mutagenų poveikio fosfodeoksiriboziniam karkasui, ir antrinius, atsirandusius dėl reparacijos, rekombinacijos ir kt., tačiau ir pirminiai trūkiai jau yra įvykusių DNR pažaidų – purino-pirimidino laisvųjų radikalų, DNR sąryšų ir kt. pasekmė;
- **interkaliacija** – mutageno molekulė įsiterpia į DNR. Po DNR replikacijos tokiose vietose atsiranda rėmelio poslinkio mutacijos. Sukelia specifiniai cheminiai mutagenai akridinai, fenazinai ir kt.

Šį pažaidų sąrašą papildo **klaidingai įjungti** ir apskritai įjungti purino (aminopurinas) ir pirimidino (bromuracilas) **bazių analogai arba nukleotidų sekos, įsiterpusios į DNR** (insercinė mutagenezė).

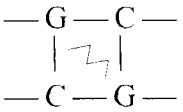
Nukleotidų modifikacija nustatoma chromatografiškai, prieš tai suskaidžius DNR. Įvairūs mutagenai skirtingai modifikuoja nukleotidus (7.16 pav.):

- gali **prisijungti** didesnis ar mažesnis **radikalas**; tai jau minėti aduktai;
- **bazės deamininamos**, pvz., nitrito rūgšties (HNO_2): adeninas (A) virsta hipoksantinu (Hx), citozinas (C) – uracilu (U),guaninas (G) – ksantinu (X);
- **vienos bazės tiesiogiai virsta kitomis**, kaip tai atsitinka deaminant citoziną: šis virsta uracilu; deamininant metilcitoziną atsiranda timinas;
- **susidaro bazių laisvieji radikalai** (žr. 7.5 pav. ir p. 469);
- **bazės visiškai suyra** į įvairius darinius, kaip tai atsitinka po sąveikos su laisvaisiais radikalais (susidaro šlapalas, β-ureidoizobutilo rūgštis, O-alkilhidroksil-aminas);
- **modifikuojama fosfato rūgšties liekana**. Tai, pvz., atlieka alkilinančiosios medžiagos. Susidaro nepatvarus triesteris, kuris lengvai hidrolizinasi, atsistatant normaliai DNR sandarai (vieta „a“) arba atskylant nukleozidui (vieta „b“):



AP saitai yra dažna DNR pažaida. Ji atsitinka, kai nutrūksta N-glikozidinis ryšys ir išsilaisvina bazė. Gana daug AP saitų atsiranda fiziologinėmis sąlygomis (pvz., dėl pH pokyčių). Fosfodiesterinis karkasas išlieka, bet pasidaro jautrus šarmams.

Įvairių tipų sąryšų reikšmė mutagenezei menkai ištirta. Dažniausiai jos ląstelei yra mirtinos. Geriau ištirtos yra vidugrandinės ir tarpgrandinės sąryšos. Jos trikdo DNR replikaciją. Sąryšų vietose **DNR trūkinėja**, ir **ląstelė žūva**, todėl mutagenai, sukeliantys sąryšas, vartojami kaip **priešvėžiniai vaistai**. Būtent dėl šios priežasties vartojamos ir bifunkcinės arba polifunkcinės alkilinančiosios medžiagos. Viena jos alkilo grupė jungiasi su viena DNR grandine, o antra – su kita:



$\rightarrow$ G ∧∧ G.

Tokie surišti guaninai (G ∧∧ G) iš DNR gali būti pašalinti. Tada susidaro dvigrandžiai DNR trūkiai (pavaizduoti guaninai, nes ši bazė alkilinama intensyviausiai; žr. toliau). Ir šiaip jau sąryša trukdo DNR replikaciją, todėl DNR trūkinėja.

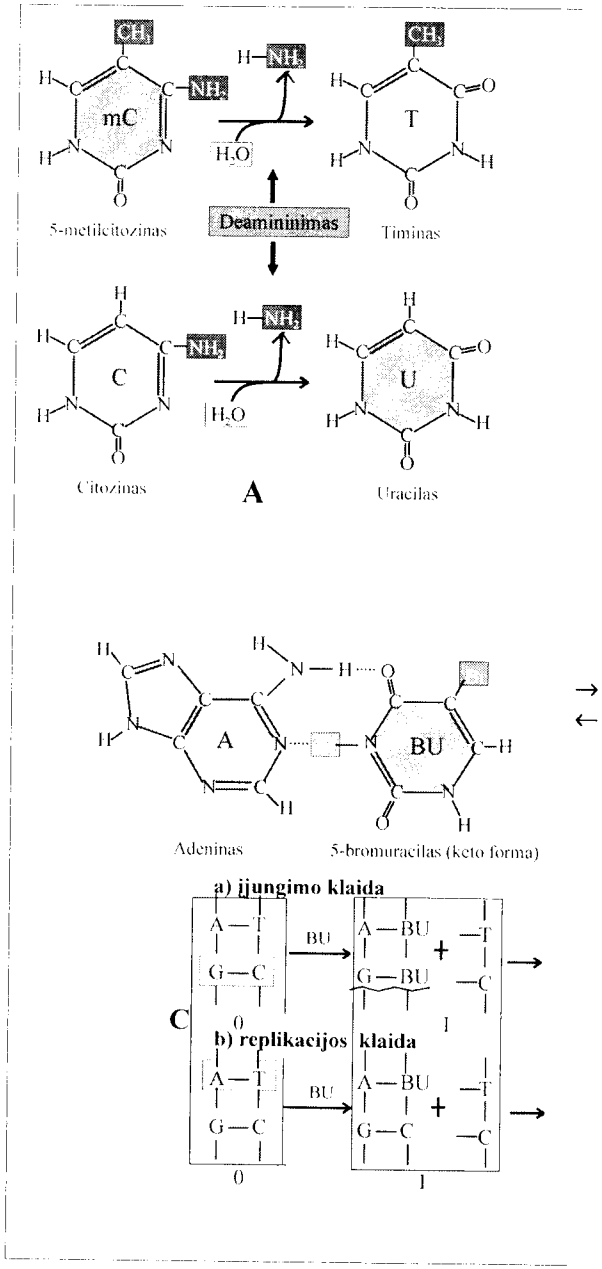
Nekovalentinis įjungimas. Interkaliacija. Daug medžiagų, kurių molekulės yra mažos, bet teigiamo krūvio, gali sąveikauti su DNR interkaliacijos (lot. *intercalatio* – intarpas) būdu, įsiterpdamos į DNR molekulę. Jos **nekeičia nukleotidų**, todėl suskaidžius DNR ir chromatografuojant neaptinkama modifikuotų nukleotidų. Tai rodo, kad mutagenas gali būti interkaliacinis. Tokie mutagenai trukdo DNR replikaciją, todėl atsiranda DNR trūkiai. Irgi vartojami kaip priešvėžiniai vaistai.

Potencialios DNR pažaidos. Tik dalis DNR pažaidų (kai kurios nukleotidų pažaidos, dalis apurininių-apirimidininių saitų ir įvairių tipų trūkių) gali virsti genų mutacijomis. Kitos pažaidos gali būti pradinė medžiaga chromosomų mutacijoms atsirasti.

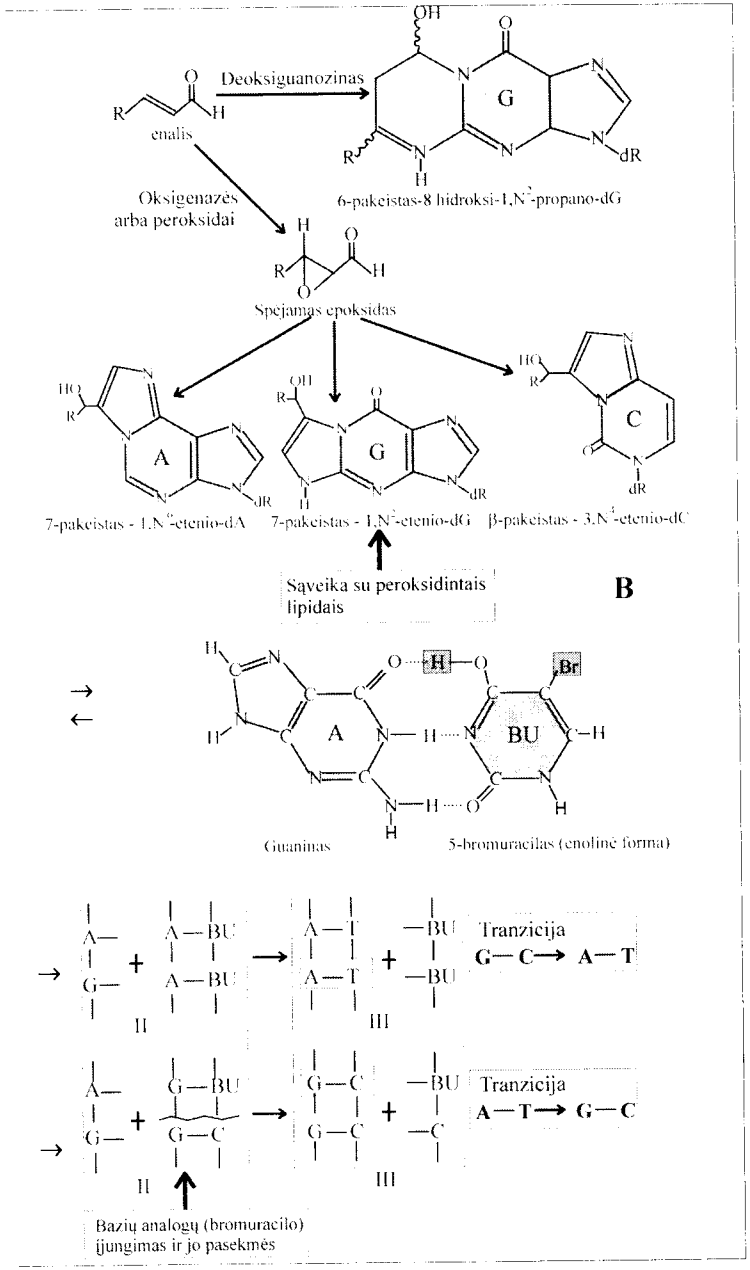
> DNR pažaida dar nėra mutacija, ir tik nedaug jų virsta mutacijomis, todėl tos DNR pažaidos, kurios gali virsti mutacijomis, vadinamos **potencialiomis**.

Potencialių pažaidų sąvoka ypač vartojama kalbant apie modifikuotus nukleotidus. Kaip pavyzdį išnagrinėkime alkilinimo pasekmes. Tai pravartu žinoti, nes alkilinimas – viena iš pagrindinių mutagenezės priežasčių. Be to, alkilinančiosios medžiagos yra vienos iš geriausiai ištirtų mutagenų.

Alkilinančiosios medžiagos. Jų sąveikai su DNR nereikalinga replikacija, t. y. DNR alkilinama bet kuriuo metu. Alkilinančiųjų medžiagų mutageninis poveikis gali būti ne tik tiesioginis (DNR alkilinimas), bet ir netiesioginis (reakcija su replikacijos, reparacijos ir kitais fermentais, antrinių mutagenų susidarymas). Konkrečiai išnagrinėsime tik tiesioginę alkilinančiųjų medžiagų sąveiką su DNR.



7.16 pav. **Nukleotidų modifikacija ir jos pasekmės:**
A – deamininimas: 5–mC→T yra viena pavojingiausių mutageniškų pažaidų;
B – peroksidintų lipidų sąveika su purino ir pirimidino nukleotidais; *C* –



5-BU įjungimo (*a*) ir replikacijos (*b*) klaidos (pažymėtos vingiuotai) ir jų mutageniškos pasekmės; mutacijai atsirasti būtini trys DNR replikacijos ciklai

Bazių alkilinimas. Sąveikaujant alkilinančiosioms medžiagoms su DNR, prie purino bazių ir citozino N atomų gali būti prijungiamos alifatinės grupės. Rečiau alkilinamas guaninas per deguonies atomą šeštoje padėtyje.

Alkilo grupės prie azoto atomų jungiasi tokiu intensyvumu:

DNR: **N-7** guanine > **N-3** adenine ≈ **O^6** guanine > **N-1** adenine > **N-1** citozine ir kt.

RNR: **N-7** guanine > **N-1** adenine > **N-1** citozine > **N-3** adenine.

Vadinasi, intensyviausiai alkilinamas guaninas N-7 padėtyje (apie 70% visų alkilintų bazių). DNR adeninui N-3 padėtyje ir guaninui O-6 padėtyje tenka maždaug po 10% visų alkilintų bazių. Alkilintos bazės hidrolizuojamos glikozidinio ryšio vietoje, t. y. tarp bazės ir cukraus, todėl DNR atsiranda apurininiai bei apirimidininiai saitai.

Kad įvyktų mutacija, vieną normalų nukleotidą DNR molekulėje turi pakeisti kitas normalus nukleotidas. Paprastai tai įvyksta DNR replikacijos metu. Modifikuota bazė netiksliai jungiasi su kita baze kitoje DNR grandinėje.

Potenciali pažaida yra guanino alkilinimas per deguonį šeštojoje padėtyje. Būtent šioje padėtyje alkilintas guaninas gali klaidingai jungtis sudarydamas porą su timinu: atsiranda **tranzicija** (purinas keičiamas purinu – **G → A**):

G – C → A – T

Potencialūs pirimidino dimerai. Iš pradžių manyta, kad, apšvitinus UV, mutageniška yra dažniausia pažaida – ciklobutaniniai dimerai. Vėliau buvo įrodyta, kad potenciali pažaida yra **6–4 fotoproduktai** (žr. 7.6 pav.). Tačiau kad ir sudėtingai, bet genų mutacijos gali atsirasti ir dėl ciklobutaninių dimerų.

Endogeninės kilmės DNR pažaidos yra tarp pagrindinių spontaninių mutacijų priežasčių, tačiau jas tirti yra sunkiau, negu egzogeninių mutagenų padarytas DNR pažaidas, todėl pastoviai tobulinami metodai šias pažaidas aptikti ir kiekybiškai įvertinti. Stebina labai didelis endogeninių DNR pažaidų dažnis. Antai žmogaus ląstelės genomas tik per vieną parą pažeidžiamas tūkstančius kartų (7.3 lentelė), todėl labai svarbi pusiausvyra tarp šių pažaidų atsiradimo ir reparacijos.

7.3 lentelė. **Endogeninės DNR pažaidos žmogaus ląstelėse** (iš T. A. Kunkel, 1999, remiantis T. Lindahl)

Pažaida	Atsiradimo būdas	Liekanų, susidariusių per parą, skaičius
Uracilas	citozino deamininimas	400
Timinas (vietoje C)	5-metilcitozino deamininimas	30
Hipoksantinas	adenino deamininimas	10
8-oksoguaninas	guanino oksidavimas	~1000
FAPY	guanino oksidavimas	~200
Timino glikolis ir kiti panašiai oksiduoti pirimidinai	pirimidinų oksidavimas	~500
Etenas C	peroksidintų lipidų poveikis citozinui	~200
Etenas A	peroksidintų lipidų poveikis adeninui	~200
3-metiladeninas	adenino SAM metilinimas	600
7-metilguaninas	guanino SAM metilinimas	4000
O^6-metilguaninas	alkilinimas endogeniniais nitrozoaminais	~200
AP saitai	hidrolizinis depurinizavimas	9000

7.5. Antimutagenezė ir DNR reparacija

7.5.1. Mutagenezės etapai ir antimutagenezė. Mutagenų taikiniai

Iš pradžių mutacijų atsiradimas buvo įsivaizduotas labai paprastai, kaip vienaaktis veiksmas. Tereikia mutagenui pakeisti genetinę medžiagą, ir štai turime mutaciją.

Mutageno sąveikos su DNR tyrimai nulėmė sampratą, kad
- pati DNR pažaida dar ne mutacija;
- mutacijų atsiradimas yra **procesas**, kuris trunka keletą DNR reprodukcijų.

Tačiau kaupėsi ir kaupiasi naujos žinios apie mutagenezę. Ilgainiui keitėsi ir keičiasi požiūris į šį reiškinį. Kokie tie poslinkiai?

Antimutagenai. Noviko ir Scilardo atrasti antimutagenai mažina spontaninių ir indukuotų mutacijų dažnį. Pirmieji antimutagenai buvo laisvos bazės ir nukleotidai. Tačiau visi suvokė, kad **antimutagenezė** yra perspektyvi kryptis reguliuoti mutacijų dažnį, sumažinti žalingą mutagenų poveikį. Todėl naujų antimutagenų, ypač slopinančių žalingą jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį, paieškos buvo labai intensyvios ir vaisingos. Antimutagenų sąrašą papildė tioliai, fenoliai, flavonoidai, tarp šio tipo antimutagenų atsirado vietos ir fermentui katalazei, kuri skaido peroksidus.

Antimutagenus pradėta skirstyti į:

32. 1313

- gamtinius ir sintetinius;
- universalius ir specifinius.

Labiausiai domino **universalieji antimutagenai**, kurie gali slopinti kuo didesnį skaičių mutagenų. Universalumu labiausiai pasižymi gamtiniai antimutagenai glutationas (ir kiti gamtiniai tioliai), askorbo rūgštis, tokoferolis, karotinoidai. Visi jie pirmiausia slopina laisvaradikalinę mutagenezę, o kaip buvo galima įsitikinti, visi keliai veda į laisvuosius radikalus. Galų gale pradeda vykti laisvaradikalinės sąveikos, susidaro laisvieji radikalai.

Glutationas ir kiti tioliai labai veiksmingai slopina ir alkilinančiąsias medžiagas. Su jomis glutationas reaguoja tiesiogiai. Susidaro merkapturo rūgštis, kuri iš organizmo pašalinama su šlapimu. Reakcija tarp glutationo ir ksenobiotikų vyksta ir tiesiogiai, bet neintensyviai. Todėl organizme šią reakciją atlieka fermentai **glutation-S-transferazės.**

Mutagenezės etapai. Aiškėjo, kad nauja mutacija turi įsitvirtinti genome, mutantinė ląstelė – kitų ląstelių sistemoje. Tiek ląstelės viduje, tiek prieš mutantines ląsteles veikia įvairūs galingi atrankos būdai. Mikroorganizmams keičiant mitybos ir kitas sąlygas šiuo etapu, buvo gaunami labai skirtingi mutagenezės rezultatai.

Gerokai vėliau buvo nustatyta, kad ir vieną normalų nukleotidą pakeitus kitu normaliu nukleotidu dar neįsitvirtina mutacija. Tokį nukleotidą gali pašalinti **nesuporuotų nukleotidų reparacija**. Taip pat nustatyta, kad yra galingas sietas, kuris gali praleisti ar nepraleisti naują mutaciją. Iš esmės mutagenezė yra valdoma (žr. toliau).

1967 m. **Auerbach** pasiūlė **mutagenezę suskirstyti į tris etapus**. Skirstymas etapais pasipildė naujomis žiniomis, ir dabar jis atrodytų taip:

I. ***Iki mutageno sąveikos su taikiniu***	II. ***Mutageno sąveika su taikiniu*** **ir visi reiškiniai taikinio lygmenyje (tarp jų – DNR reparacija)** ***taikinys – ne tik DNR***	III. ***Po sąveikos su taikiniu***
a) **mutageno patekimas**;	a) DNR sintezės, rekombinacijos, reparacijos baltymai (pvz., topoizomerazės) – **genų ir chromosomų mutacijos**;	a) mutantinių ląstelių išgyvenimas ir atranka – **diplontinė atranka**;
b) **mutageno sąveika su antimutagenais ir ekranuojančiais veiksniais**;	b) tubulinai bei kiti achromatinės verpstės ir ląstelės ciklo baltymai – **genomo mutacijos**	b) **konjugacinė antimutagenezė** – mejozės sietas;
c) **sąveika su fermentais, inaktyvuojančiais patį mutageną**		c) **individų** su dideliu naujų mutacijų krūviu **eliminacija** (persileidimai, autoimuninė liga, vėžys);
		d) **atranka lytinių ląstelių lygiu** (teratomos, apsivaisinimas).

Daugelis reiškinių jau nagrinėti arba bus vėliau nagrinėjami (DNR reparacija). Čia kiek smulkiau apie keturis iš jų: I etapo – mutageno

patekimas ir ekranavimas, III etapo – diplontinė atranka ir konjugacinė antimutagenezė.

Mutageno patekimo valdymas yra toks įprastas reiškinys, kad į jį žiūrime kaip į savaime suprantamą dalyką. Evoliucija vyko kaip tik taip, kad lytinės ląstelės ir gemalas būtų maksimaliai apsaugoti nuo nepalankių veiksnių. Be to, žinduolių galingas filtras yra placenta. Ji gerokai apsaugo gemalą nuo mutageninių medžiagų. Prisiminkime, kad placenta yra vienas iš tų organų, kurių ląstelėse labai aktyvūs ksenobiotikų biodegradacijos fermentai.

Sausumoje lengviau gali gyventi daugialąsčiai organizmai. Jų vidinėms ląstelėms nėra kenksmingi UV, nes jie yra menko skvarbumo. **Odos** apsauginė paskirtis irgi gerai žinoma. Be to, joje yra **gamtinių apsauginių medžiagų**: keratino, melanino, urokanino rūgšties ($C_6H_6O_2N_2$). Pastaroji ypač aktyvi prieš UVB.

Vienaląsčius nuo UV kažkada saugojo **vanduo**. Jis ir buvo gamtinis ekranas nuo UV. Ši sąvoka į mutagenezę atėjo iš radiobiologijos. Pavyzdžiui, švitinant kaulavaisių sėklas, ekranas yra storas sėklos kauliukas. Dalį jonizuojančių spindulių sugeria sėklos endospermas. Ląstelės viduje alkilinančiąsias medžiagas ekranuoja baltymai. Apie 2/3 visų alkilinimų ląstelės viduje tenka ne DNR, o baltymams ir daugiausia ląstelės membranų ir priemembraniniams baltymams. Iki branduolio tolimas kelias. Todėl daugelyje atsakų, kuriuos toliau nagrinėsime, aktyvinami šiluminio šoko proteazių, ubikvitino genai. Jų koduojami baltymai skaido denatūruotus baltymus.

Kontakto efektas. Daugialąsčio organizmo ląstelės gali padėti viena kitai apsisaugoti nuo mutageno poveikio. Tai nustatyta kartu auginant leukocitus, kurių vieni buvo neapšvitinti, kiti apšvitinti jonizuojančiaisiais spinduliais. Pastaruosiuose tirtos chromosomų aberacijos. Jų dažnis gerokai sumažėjo, palyginti su apšvitintais leukocitais, augintais atskirai, nuo neapšvitintų ląstelių. Ši vienų ląstelių pagalba kitoms buvo pavadinta kontakto efektu. Nustatyta, kad iš vienų ląstelių į kitas gali pereiti antioksidantai ir tioliai.

Diplontinė atranka. Daugialąstį organizmą paveikus mutagenais, pakinta tik dalis jo ląstelių. Kitos lieka normalios. Kaip jau minėta, dauguma mutacijų yra žalingos, todėl ir mutantinės ląstelės gali būti mažiau gyvybingos. Tarp normalių ir mutavusių ląstelių arba net audinių vyksta konkurencija normalių ląstelių naudai. Dažnai net normalių ląstelių dalijimosi tempas didesnis. Galime įsitikinti stebėdami įvairius margalapius augalus: normaliai žalia lapo dalis dažnai būna kur kas labiau išsiplėtusi negu mutantinė (7.17 pav.).

7.17 pav. **Diplontinė atranka:**
pupų chlorofilinio mutanto *variegata* normali žalia lapo dalis lenkia mutantinę šviesią lapo dalį

Konkurencija tarp diploidinių normalių ir mutantinių to paties organizmo ląstelių vadinama **diplontine atranka.**

Normalus audinys gali visiškai nustelbti mutantinį audinį.

Konjugacinė antimutagenezė pasireiškia mejozėje. Pašalinami stambūs struktūriniai chromosomų pokyčiai. Kaip minėta, heterozigotinėje būklėje įvairios chromosomų mutacijos pasišalina mejozėje, nes susidaro negyvybingos lytinės ląstelės. Be to, mejozės pirmojo dalijimosi zigotenoje ir pachitenoje vyksta DNR reparacija.

Augalų ir gyvūnų mejozės mutantų yra pažeista konjugacinė antimutagenezė, todėl jie daug jautresni mutagenams. Jonizuojančioji spinduliuotė juose sukelia daugiau chromosomų aberacijų.

Prasmukusios pro mejozę naujos mutacijos gali būti atsijojamos

- ovocitams virstant teratomomis;
- mažiau energingiems spermatozoidams neatlaikant konkurencijos apsivaisinimo metu;
- nenormalūs gemalai žūva, vykstant persileidimui.

Pasak žmogaus genetikos autoritetų Fogelio (F. Vogel) ir Motulskio (A. G. Motulsky), mutacijos, dėl kurių vyksta ankstyvi abortai, gali likti nepastebėtos. Anot Fogelio ir Motulskio, apie 90% chromosomų mutacijų pasišalina vykstant embriogenezei, daugiau kaip pusė jų – iki implantacijos gimdoje, o dauguma likusiųjų – netrukus po

implantacijos. Daug chromosomų mutacijų vis dėlto įveikia šį „filtrą“. Embriogenezės metu atsiranda ir naujų mutacijų.

Kokia galinga III etapo antimutagenezė, galima įsitikinti remiantis Hirosimos ir Nagasakio atominius bombardavimus patyrusių asmenų tyrimų rezultatais. Japonų mokslininkai įsitikino, kad net po 30 metų nuo bombų sprogimo apšvitintų žmonių leukocituose vis tebėra daug chromosomų aberacijų (7.4 lentelė). Be to, jų dažnis tiesiog proporcingas apšvitinimo dozei. Tuo tarpu tiriant tokių žmonių palikuonis jokio žymesnio genų mutacijų dažnio pokyčio nepastebėta.

7.4 lentelė. **Žmonių, patyrusių Hirosimos ir Nagasakio bombardavimą, chromosomų aberacijų dažnis leukocituose, praslinkus 30 m. po bombardavimo** (pagal N. Dubininą, 1986)

Spinduliuotės dozė Gy	Aberacijų dažnis %	
	Hirosima	Nagasakis
Kontrolė	1,20	1,35
0,01–0,99	2,71	1,88
1,00–1,99	4,95	1,68
2,00–2,99	9,48	2,76
3,00–3,99	12,55	3,41
4,00–4,99	14,19	7,09
5,00 ir daugiau	16,51	13,15

7.5.2. DNR pažaidų reparacija

7.5.2.1. DNR pažaidų reparacijos apibūdinimas ir tipai

Genetinė medžiaga DNR yra labai stabili. Nukleotidų įjungimas į naujai sintetinamas DNR grandines irgi vyksta palyginti tiksliai. O jeigu ir padaroma klaidų, tai jas ištaiso tie patys DNR sintezės fermentai. DNR polimerazės atlieka korekciją, šalindamos neteisingai įjungtus, nesuporuotus nukleotidus (žr. II sk.). Tačiau klaidų vis tiek lieka.

Ne be pamato manoma, kad **DNR ypatingo stabilumo priežastis** yra ne tiek jos cheminė sandara ir sintezės ypatumai, kiek DNR pažaidų reparacija (lot. *reparatio* – atitaisymas). Vienu metu genetikai net labai rimtai svarstė, kaip atsiranda mutacijos, jeigu DNR pažaidų šalinimo sistemos yra tokios galingos. Klaidų labai padaugėja DNR paveikus mutagenu.

Mutagenas ne tik sukelia potencialias DNR pažaidas, bet ir pažeidžia visą suderintą DNR saugos sistemą: DNR replikacijos ir reparacijos fermentus ir sutrikdo DNR kopijų dalybas dukterinėms ląstelėms.

Šis netiesioginis mutageno poveikis, matyt, ir nulemia, kurie mutagenai yra silpni, o kurie stiprūs. **Stiprieji mutagenai pirmiausia pažeidžia saugos sistemas.**

DNR reparacijos tipai. DNR pažaidų reparacijos tipų klasifikacija sudėtinga ir daug kuo panaši į ksenobiotikų biodegradacijos – citochromų P-450 sintezės klasifikaciją.

DNR reparacijos tipai yra **specialūs** ir **universalūs**, **vieną DNR reparacijos sistemą dubliuoja kitos,** yra **konstitutyvūs ir indukuoti reparacijos tipai:**

- **specialūs** DNR reparacijos tipai pašalina konkrečias DNR pažaidas. Tai tokios pažaidos, kurioms atsirasti yra beveik 100% tikimybė.
- **universalūs** DNR reparacijos tipai pašalina bet kokias DNR pažaidas, tarp jų padarytas ir tų mutagenų, kurie įprasti organizmo aplinkoje ir kurios šalinamos specialiais DNR reparacijos būdais.

Tai, kad viena pažaida šalinama keliais būdais, yra organizmo strategija, susikūrusi ilgametės atrankos būdu. Pažaidos šalinimo būdų dubliavimas – garantija, kad ši DNR pažaida bus pašalinta.

Antai organizmams įprastas ir net „istorinis" veiksnys yra ultravioletiniai spinduliai. Prisiminkime, kad jie sukelia labai savitas DNR pažaidas – pirimidino dimerus. Juos pašalina irgi labai savitas DNR pažaidų reparacijos tipas – fotoreaktyvacija. Vien UV sukelia pirimidinų dimerus, fotoreaktyvacija tik juos pašalina. Pirimidinų dimerai šalinami ir kitais DNR reparacijos būdais. Jie iškerpami eksicinukleaze. Šis būdas yra universalus. Juo šalinamos įvairios DNR pažaidos. Tik pirimidino dimerus šalina pirimidindimerDNR N-glikozilazė-AP--endonukleazė. (Apie abu šiuos tipus žr. toliau.)

Likusias nepašalintas iki DNR replikacijos pažaidas šalina poreplikacinė DNR pažaidų reparacija. DNR pažaidų reparacija dar skirstoma į:

- priešreplikacinę,
- poreplikacinę.

Mutageniška, arba klaidinga, reparacija. Šio DNR reparacijos tipo atradimas – **esminis visos mutagenezės teorijos posūkis**. Dar 1953 m. Veiglas (J. J. Weigle) aptiko reiškinį, kurį jis pavadino **ultravioletine reaktyvacija**. Virusai buvo apšvitinami virusui *mirtinomis* UV dozėmis. Šiais inaktyvintais virusais buvo užkrečiamos bakterijos. Vienos jų buvo

- prieš tai neapšvitintos UV,
- kitos apšvitintos *nemirtinomis* UV dozėmis.

Tose bakterijų ląstelėse, kurios prieš užkrečiant jas inaktyvintais virusais buvo apšvitintos UV, virusai atgijo, reaktyvinosi. Bet tarp jų pasitaikė labai daug su mutacijomis.

Aprašytasis DNR reparacijos būdas buvo pavadintas **Veiglo reaktyvacija**, arba kitaip **W-reaktyvacija**, o mutacijų atsiradimas reaktyvintoje DNR – **Veiglo mutageneze**, arba **W-mutageneze**.

Veiglas pirmasis atrado mutageniską DNR reparacijos tipą. Tačiau šiam tipui daug reikšmės nebuvo teikiama tol, kol neiškilo klausimas: „O vis dėlto kaip atsiranda mutacijos?" Iš esmės mutageniška DNR reparacija buvo atrasta pakartotinai kaip SOS atsako dalis (žr. toliau). Šiuo metu nustatyta, kad mažos, nemirtinos įvairių mutagenų (ne tik UV) dozės sukelia (indukuoja) reparacijos genų veiklą.

Kokia bus DNR reparacija – mutageniška ar nemutageniška, priklauso nuo dviejų aplinkybių:

- nuo DNR pažeidimo laipsnio. Mutageniška reparacija vyksta itin stipriai pažeistoje DNR (pvz., kaip stipriai pažeistų, inaktyvintų UV virusų reparacija). Čia ji vyksta nelaimės verčiama. Nieko kito nelieka: arba užtaisyti DNR pažaidą bet kaip, arba žūti;
- nuo genotipo ypatybių, specialių genų. Tai mutagenezės valdymo būdas (žr. toliau).

DNR pažeidimo laipsnis ir pažaidų reparacija. Indukuota DNR pažaidų reparacija. Vėlgi pasireiškia organizmo strategija. DNR pažaidų reparacija reikalauja didelių energijos sąnaudų, ATP. Ne kiekviena ląstelė ir organizmas išgali likviduoti DNR pažaidas. Todėl stengiamasi DNR pažaidas šalinti pačiais paprasčiausiais būdais:

- jeigu pažaidų nedaug, pakanka konstitutyvaus DNR pažaidų reparacijos lygio;

- kai ląstelė pažaidų nesugeba likviduoti konstitutyviu būdu, indukuojami specialūs pagal pažaidų pobūdį ir stiprumą DNR reparacijos būdai. Jie įsijungia laipsniškai, didėjant DNR pažeidimui.

Tuo įsitikinsime išnagrinėję du DNR reparacijos reiškinius: SOS ir oksidacinio streso atsakus.

DNR reparacija yra visos antimutagenezės sistemos dalis. Organizmui geriau pirmiausia paprastesniais būdais pašalinti patį mutageną, negu po to eikvoti ląstelės išteklius ir šalinti genotoksiškai pavojingas DNR pažaidas. O jeigu atsirado DNR pažaidų, tai paprasčiau jas likviduoti, negu ekscizijos būdu šalinti bazes, nukleotidus ar net DNR nukleotidų sekas. Kai jau nieko kito nebelieka, vyksta mutageniška DNR reparacija: atsiradę stambūs DNR trūkiai užtaisomi netiksliai, kad tik būtų išsaugota vientisa DNR.

DNR reparacijos priklausomybė nuo įvairių veiksnių. Tai klausimas, kuriuo šiuo metu itin domimasi. DNR reparacija priklauso nuo daugybės veiksnių.

Ji priklauso nuo:

- bendros ląstelės būsenos, energetinių ląstelės išteklių, pakankamo naujų nukleotidų kiekio;
- DNR ir chromatino sandaros ypatybių (Z formos DNR nereparuojama), chromatino nukleosominės sandaros (geriau reparuojama DNR, kai histonai yra acetilinti, t. y. kai susilpnėjęs ryšys tarp DNR ir histonų);
- genų aktyvumo: pirmiausia reparuojami aktyvūs genai, o aktyviuose genuose – transkribuojamoji DNR grandinė;
- įvairių DNR sintezės, reparacijos, chromatino sandaros modifikatorių (pvz., poliaminų, dvivalenčių ar trivalenčių metalų jonų ir kt.). Kofeinas veikia kaip mutagenas ne tiesiogiai, slopindamas DNR reparaciją.

Čia suminėta tik nedidelė dalis DNR reparaciją keičiančių veiksnių.

7.5.2.2. Tiesioginė DNR pažaidų reparacija. Ekscizinė reparacija

Šiuo metu žinomi **trys tiesioginio DNR pažaidų šalinimo būdai.** Visi jie yra savitų DNR pažaidų, sukeliamų labiausiai istoriškų, tradicinių veiksnių:

- *UV* → visų tipų pirimidino dimerų = fotoreaktyvacija, atlieka **fotoliazės**;
- **alkilinančiųjų medžiagų** → alkilintų nukleotidų = alkilo grupės šalinimas, atlieka **metiltransferazės**;

- **jonizuojančiosios spinduliuotės ir kitų veiksnių** → purino-pirimidino bazių laisvųjų radikalų = **cheminė reparacija**, kurią atlieka antioksidantai ir tioliai.

Fotoreaktyvacija. Reiškinys žinomas seniai, atrastas bent tris kartus. Apšvitinus organizmus UV ir po to matoma šviesa, žalingas UV spindulių poveikis sumažėja ar net visai išnyksta. Šiuo reiškiniu rimtai susidomėta tik po to, kai Kelneris (A. Kelner) ir Dulbeko (R. Dulbecco) 1949 m. įrodė, kad fotoreaktyvacija vyksta ir mikroorganizmuose. Ji pasireiškia taip. Apšvitinti UV spinduliais (200–300 nm) ir toliau auginami patamsyje (įprastinės sąlygos termostatuose) mikroorganizmai žūva. Bet jeigu po UV dar švitinsime matoma šviesa (300–500 nm), daug mikroorganizmų ląstelių atgys. Kaip tai atsitinka? *Escherichia coli* ląstelėse buvo aptiktas fermentas, kuris pirimidino dimerus paverčia monomerais – atstato normalią padėtį:

$$T+T \xrightarrow{UV} \widehat{T\,T} \xrightarrow[\text{Fotoliazė}]{\text{Matoma šviesa}} T+T$$

Šis fermentas pavadintas fotoliaze. Jis pažįsta tik **ciklobutaninius pirimidinų dimerus**, todėl šiuo metu vadinamas **CPD fotoliaze.** Atrasta dar viena fotoliazė, kuri pažįsta tik **(6–4) fotoproduktus** (neciklobutaninius dimerus). Ji vadinama **(6–4)-fotoliaze** (7.6 pav.). Tai flavoproteinai.

Žinotina tai, kad fotoliazės ir tamsoje pažįsta DNR pažaidą, o sužadintos šviesos ir panaudodamos fotono energiją, dimerus paverčia monomerais. Pašalina pažaidą.

Pirmiausia bandoma apsisaugoti nuo UV spindulių (minėtieji ekranai, chromatoforai). Padidėjus UV spinduliuotei, irgi iš pradžių saugomasi nuo UV, o tik paskui likviduojamos jų padarytos DNR pažaidos. Žmogaus – padidėja melanino, augalų – flavonoidų sintezė.

Alkilo grupių pašalinimas. DNR alkiltransferazės. DNR alkilinimas (metilinimas) yra viena iš natūralių DNR modifikacijų, todėl ląstelėje yra tam tikras pastovus, konstitutyvus demetilazių (metiltransferazių) lygis. Be to, atsiradusius alkilinančiuosius metabolitus veiksmingai nukenksmina tioliai.

Metiltransferazės – ypatingi fermentai. Net ginčijamasi, ar tai apskritai yra fermentai: reakcijų jie nekatalizuoja, tiksliau, po sąveikos su alkilo grupe jie patys suskyla.

Ada-metiltransferazės turi du aktyvius centrus – cisteino liekanas:

- **Cys-69 padėtyje** pašalina alkilo grupę nuo alkilintos fosfato rūgšties liekanos (metilfosfotriesterio);
- **Cys-321 padėtyje** pašalina alkilo grupę nuo pačios pavojingiausios, potencialios pažaidos O^6-metilguanino (O^6-metG), silpniau O^4-metT.

Alkilo grupė šalinama savotiškai: ji nuo nukleotido peršoka ant metiltransferazės, ir ši suskyla.

Toje pačioje ląstelėje yra ne viena metiltransferazė. Tai vis ta „apsidraudimo" strategija.

Purino-pirimidino bazių laisvųjų radikalų cheminė reparacija. Tai unikalus reiškinys. Paprastai DNR pažaidų reparaciją atlieka fermentai. Bazių laisvuosius radikalus reparuoja

- tioliai (H^+ donorai) C-centrinius,
- antioksidantai ($\bar{e}$ donorai) heterociklinius rezonansinius (žr. 7.5 pav.).

Tioliai ir antioksidantai veikia ir kaip laisvųjų radikalų gaudyklės. Sąveika vyksta dviem etapais:

1) antioksidantas virsta laisvuoju radikalu:

$$2\ Pu^{\bullet} \text{ arba } 2\ Py^{\bullet} + 2\ InH \rightarrow 2\ Pu \text{ arba } 2\ Py + 2\ In^{\bullet};$$

2) vyksta disproporcionavimo (dismutacijos) reakcija, ir laisvieji radikalai naikinasi:

$$In^{\bullet} + In^{\bullet} \rightarrow In\text{-}In;$$

čia In – sintetinis antioksidantas jonolas.

Panašiai laisvuosius radikalus naikina superoksiddismutazės.

Ekscizinė reparacija (angl. *excision* – išpjovimas). **Bazių ekscizją** atlieka konkrečioms DNR pažaidoms specifinės **DNR N-glikozilazės**. Jos atpažįsta konkrečią pažaidą ir pašalina visą pažeistą bazę. Bazė atskeliama nuo polimero fosfodeoksiribozinio karkaso vykstant N-glikozilinių ryšių hidrolizei. Vietoj pašalintos bazės atsiranda AP-saitas.

Atrandama vis naujų N-glikozilazių:

- **uracil DNR glikozilazė** šalina uracilą, kuris atsiranda įvairiais būdais, pvz., deamininant C;

- **Hx (hipoksantin) DNR glikozilazė** šalina hipoksantiną, atsiradusį vietoj deamininto A;
- **FAPY DNR glikozilazė** šalina 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidiną (sutrumpintai FAPY), kuris atsiranda nuo poveikio laisvaisiais radikalais;
- **3-metiladenino DNR glikozilazė** šalina alkilintą 3 metA ir kitas alkilintas bazes 3metG, 7metG, O^2-metT; ji nėra griežtai specifinė;
- **8-oksoguanin DNR glikozilazė** šalina vieną iš potencialių oksidacinio streso (laisvųjų radikalų) sukeltų pažaidų 8-oksoG ir kt.

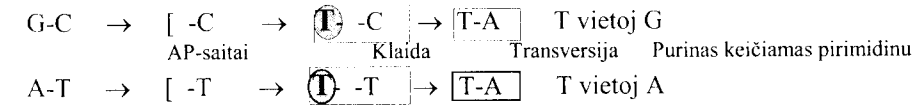
AP-saitų reparacija. AP-saitai atsiranda ne tik dėl DNR N-glikozilazių veiklos, bet ir dėl kitų veiksnių ($OH^{\bullet}$ radikalo, bazių alkilinimo ir kt.), net gamtinėmis sąlygomis, susilpnėjus N-glikoziliniams ryšiams. AP-saite fosofodiesterinis karkasas išlieka, bet tolesnis AP-saito likimas gali būti dvejopas:

- į AP vietą įstatoma bazė;
- AP-endonukleazės kerpa fosofodiesterinį karkasą, ir atsiranda vienagrandis DNR trūkis, kuris užtaisomas jau nukleotidų ekscizinės reparacijos būdu.

Insertazės. Tai fermentai, kurie įstato bazę į AP vietą. Jos irgi yra kelios priklausomai nuo įterpiamos bazės.

AP-saitai yra potencialios DNR pažaidos, nes gali būti įjungta ne ta bazė, kuri buvo anksčiau; bazės įterpimas vyksta su klaidomis.

Dažniausiai į AP-saitą įterpiama
A(59%)>T(28%)>G(11%)>C(1%).
Dėl įterpimo klaidų gali atsirasti net transversijos, palyginti su tranzicijomis (žr. p. 436), gerokai retesnis genų mutacijų tipas, pvz.:



Todėl netenka stebėtis, kodėl gamta pasirinko kad ir sudėtingesnį, bet patikimesnį būdą išvengti klaidų (mutacijų) užtaisant AP-saitus – kirpti fosfodiesterinį karkasą ir lopyti atsiradusį vienagrandį trūkį.

Nukleotidų ekscizinė reparacija. DNR N-glikozilazės-AP-endonukleazės. Kai du vyksmai eina vienas paskui kitą, gana dažnai genai,

koduojantys šias dvi atskiras funkcijas, susilieja. Atsiranda naujas genas, koduojantis polifunkcinį baltymą. Taip atsitiko ir DNR N-glikozilazių ir AP-endonukleazių genams. Atsirado genas, koduojantis naują fermentą – **DNR N-glikozilazę-AP-endonukleazę**, pvz., pirimidindimer--DNR N-glikozilazę-AP-endonukleazę.

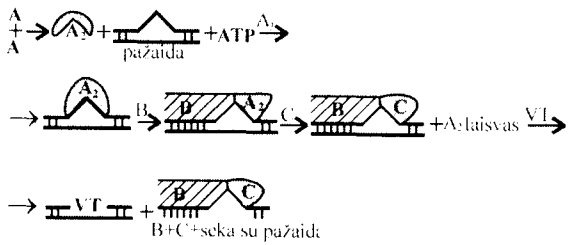
Ekscinukleazė – ne vienas fermentas, o baltymų, veikiančių tam tikra seka, **kompleksas**. Jis iliustruoja ekscizinę DNR reparaciją, kai **iškerpama nukleotidų seka**. Tiesa, ji trumputė: *E. coli* pašalinama 12 arba 13 nukleotidų atkarpa. Skirtingai nuo DNR glikozilazių-AP-endonukleazių, tai universalus DNR reparacijos tipas, nes pašalinamos įvairios DNR nukleotidų pažaidos. *E. coli* kompleksas kerpa DNR grandinę dviejose vietose (7.18 pav., *I*):

7 nukleotidai prieš pažaidą + pažaida + 4 nukleotidai po pažaidos.

Kai pažaida – dimeras (pirimidino dimeras arba dviejų nukleotidų sąryša), pašalinama 13 nukleotidų seka (40%), kitais atvejais, kai pažeistas vienas nukleotidas, pašalinama 12 nukleotidų seka.

E. coli ląstelėse kompleksą lemia **keturi genai**, aptikti pagal mutantų jautrumą UV spinduliams, todėl genai vadinami *uvr A, B, C, D*. Genas *uvr D* lemia pagalbinį, bet būtiną fermentą UvrD-helikazę.

Iškerpa *uvr A*, *uvr B*, *uvr C* genų koduojami baltymai. Iškerpama etapais:

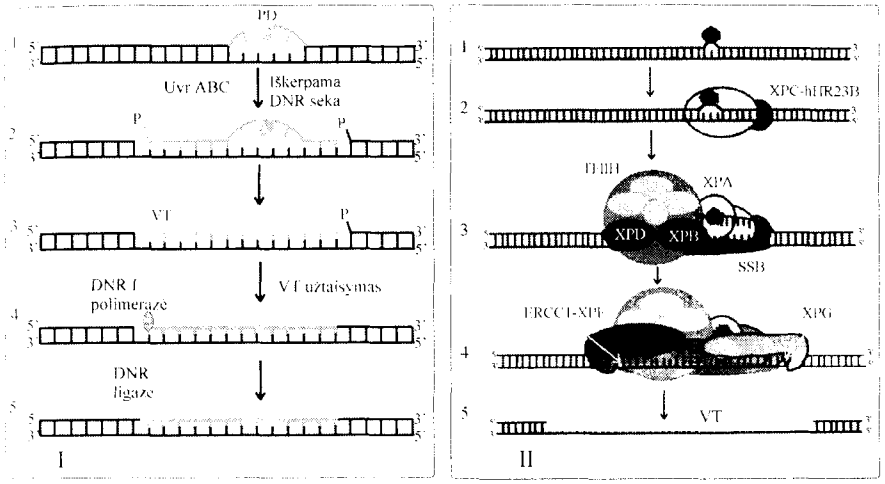


Susidaręs trūkis užtaisomas klasikiniu būdu irgi etapais (7.18 pav.):

1) plyšys gali būti platinamas;

2) bakterijų DNR I polimerazė, pasinaudodama antrąja DNR grandine kaip matrica, trūkio vietoje sintetina DNR grandinę;

3) DNR ligazė sujungia naujai susintetintos DNR grandinės galus su likusiąja DNR dalimi.



7.18 pav. ***Escherichia coli* (*I*) ir žmogaus (*II*) DNR ekscizinė reparacija:**
I – veikia baltymų kompleksas: UvrABC, UvrD helikazė, DNR I polimerazė, DNR ligazė, iš jų UvrA yra polifunkcinis baltymas, vienas arba kartu su kitais baltymais atpažįsta pažaidą ir jungiasi su DNR; UvrB yra ATPazė-helikazė; UvrC yra nukleazė; *1* – PD – pirimidino dimeras, todėl (*2, 3*) UvrABC ekscinukleazė šalina 13 nukleotidų (7+2+4); *3* – VT – vienagrandis trūkis; *4, 5* – klasikinis bet kokio vienagrandžio trūkio užtaisymo būdas: *4* – DNR I polimerazė vykdo DNR reparacinę sintezę; *5* – DNR ligazė sujungia senosios ir naujosios DNR grandinių galus.
II – veikia dar didesnis baltymų kompleksas – reparosoma: XP (*xeroderma pigmentosum*) – baltymai, atrasti ištyrus pigmentinės kserodermos komplementacijos grupes; *2* – XPC komplekse su hHR23B yra pradinis pažaidos (*1*) atpažinimo veiksnys; *3* – susidarė reparosoma, XPA įsijungia pažaidos vietoje ir yra pagrindinis ekscizinės reparacijos veiksnys; TFIIH yra tarp pagrindinių transkripcijos veiksnių, kartu su kitais transkripcijos pradžios baltymais sukuria atvirą DNR kompleksą (žr. II sk.); XPD yra 5'→3' helikazė, o XPB – 3'→5' helikazė; *4* – incizija (*1* atitinka *2*), atlieka dvi nukleazės: XPG (3' incizija) ir kompleksas ERCC1-XPF (5' incizija); tolesnė eiga kaip *1* *4* ir *5*, bet dalyvauja DNR polimerazių δ ir ε holoenzimas, DNR replikacijos veiksniai RPC, PNCA, RFC, vienagrandę DNR stabilizuojantis baltymas SSB (arba kitaip RPA) ir kiti baltymai. Priklausomai nuo DNR pažaidos šalinama 24-32 nukleotidų atkarpa. Aktyvių genų reparacija vyksta kitaip, dalyvauja genai *CSA* ir *CSB*, kurių paveldimi defektai lemia Kokeino sindromą (*II* – remiantis S. J. Araujo, R. D. Wood, 2000)

Šiuo būdu užtaisomi ir įvairūs **DNR trūkiai**. Dvigrandžiai trūkiai užtaisomi sunkiau, todėl jie letalūs. Jiems užtaisyti kaip matrica naudojama antroji diploidinio organizmo DNR molekulė.

Eukariotų ląstelėse ekscizinė reparacija kur kas sudėtingesnė. Išpjaunama ne 12–13, bet didesnė – 24–32 nukleotidų seka ir tai atlieka

sudėtingas baltymų kompleksas – **reparosoma** (7.18 pav., *II*). Komplekso sudėtis priklauso nuo DNR pažaidos. To paties geno produktai gali veikti įvairios sudėties ir paskirties reparosomose. Mielių genome už grandinės įpjovimą atsakingi bent 11 genų, žmogaus genome – apie 14 genų. Augaluose ekscizinę reparaciją pirmieji 1973 m. aptiko V. Soiferis ir K. Cieminis.

Netgi *E. coli* DNR reparacijos baltymai jungiasi į kompleksą. Toks kompleksas yra UvrABCD. Kompleksą, vadinamąją **GO sistemą,** sudaro ir baltymai, šalinantys 8-oksoG. Jį sudaro dvi specifinės glikozilazės, koduojamos *mutM* ir *mutY* genų, DNR I polimerazė ir kiti baltymai; *mutT* geno produktas trukdo 8-oksoG įsijungti į DNR.

7.5.2.3. Indukuota DNR pažaidų reparacija. Atsakai

Šiame poskyryje nagrinėjami reiškiniai yra ypatingai svarbūs. Tai labai svarbi ekologinės genetikos dalis. Jie papildo mūsų bendrą sampratą apie tai, kaip organizmas reaguoja, atsako į nepalankius, genotoksinius aplinkos veiksnius.

Atsaką į nepalankų aplinkos veiksnį paprastai lemia suaktyvėjusių arba pradėjusių visiškai **naujai veikti genų grupė reguloną.**

Čia pasitenkinsime tik Ada, SOS ir oksidacinio streso atsakais. SOS yra universalus atsakas būtent į stiprėjantį DNR pažeidimą, o kiti du – atsakai yra į pačius svarbiausius aplinkos ir vidinius genotoksiškus veiksnius: alkilinančiąsias medžiagas ir sutrikusią laisvųjų radikalų pusiausvyrą.

Ada atsakas. Tai pirmasis atsakas, kurį pradėjo tirti genetikai. Štai kodėl toks pretenzingas jo pavadinimas, kilęs nuo žodžio adaptacija. Juk ir kiti atsakai – adaptacija, prisitaikymas prie aplinkos veiksnių.

Ada atsakas buvo aptiktas atspariose alkilinančiosioms medžiagoms žinduolių, tarp jų ir žmogaus, ląstelėse. Tokios atsparios ląstelės atsiranda ilgai naudojant alkilinančiąsias medžiagas kaip priešvėžinius vaistus.

Taip buvo aptikti jau nagrinėti fermentai Ada-metiltransferazės, kurių kiekis adaptuotose ląstelėse padidėja iki 100–200 kartų. Tačiau

be *ada* geno, lemiančio Ada-metiltransferazę ir kartu esančio valdymo genu, įjungiamas bent 9 genų regulonas.

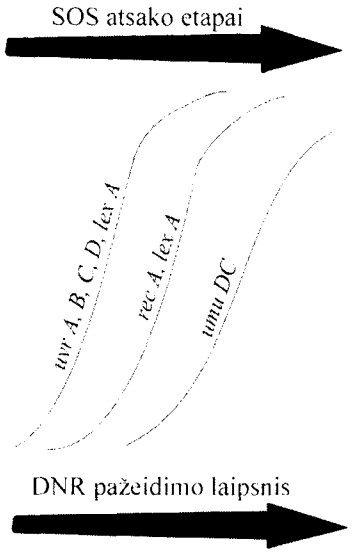
Signalas *ada* regulonui įsijungti yra fosfato liekanos alkilinimas. Prisiminkime, kad nuo fosfato rūgšties liekanos Ada-baltymas šalina alkilo grupę cisteino liekana, esančia 69-ojoje padėtyje. Tai vėlgi labai protinga, nes bazių alkilinimas (metilinimas) vyksta ir normaliai įvairiais tikslais, o fosfato rūgšties liekanos alkilinimas – jau ypatingas, netipiškas įvykis, kai reikia gelbėtis nuo indukuotų egzogeninės kilmės DNR pažaidų. **Alkilinta Cys-69 padėtyje Ada-metiltransferazė skyla pusiau.**

Vienas iš skilimo produktų yra *ada* regulono **aktyvatorius**. Tarp kitų genų aktyvinamas ir **pats *ada* genas**, kuris nuo šio momento **keičia konstitutyvų veiklos pobūdį indukuotu**. Ada atsakas įjungia įvairius genus, kurie likviduoja ir tas DNR pažaidas, kurių neįveikia Ada-baltymas. Antai *alkA* genas koduoja 3-metiladenin-DNR-N-glikozilazę, kuri pašalina 3metA, 3metG, 7metG, O^2-metT, O^2-metC.

SOS atsakas. Pats pavadinimas reikšmingas: skęstančio laivo signalas. O iš skęstančio laivo pirmosios sprunka pelės. Į SOS reparacijos atradėjus būta daug pretendentų, bet šią reparacijos rūšį aptiko prancūzų mokslininkai, pirmiausia Nobelio premijos laureatas Lvovas (A. Lwoff), smulkiai ištyręs fago indukcijos reiškinį.

Fago indukcija – viena iš SOS reparacijos apraiškų. Grynose bakterijų kultūrose atsirasdavo virusų. Iš kur jie? Pasirodo, bakterijos buvo užsikrėtusios ypatingais, nuosaikiaisiais virusais, kurie geba įsijungti į ląstelės-šeimininkės chromosomą. Su šia chromosoma jie ir pasidaugina. Tūno tol, kol pradeda „skęsti laivas“. Signalas „sprukti“ būna ląstelės-šeimininkės energijos ištekliai: ATP kiekis. Kai ATP mažai, viruso, vadinamo **profagu**, išėjimą iš chromosomos slopinantis baltymas-represorius skyla pusiau, ir vienas iš polipeptidų ne tik nustoja slopinti viruso perėjimą į autonominę būseną, bet, atvirkščiai, jį netgi skatina. Tai ir vadinama **fago indukcija**. Bendra su SOS reparacija tai, kad profago perėjimą į autonominę būseną galima dirbtinai sukelti, apšvitinus UV spinduliais.

Kita labai svarbi **SOS atsako apraiška – ląstelės dalijimosi slopinimas**. Šiam tikslui yra netgi specialūs genai (*E. coli* – *sulA* ir kt.), žinduoliai, matyt, jų turi kelis, tarp jų p^{53} (žr. p. 344). Tai būtina padaryti, nes pašalinti DNR pažaidoms, ypač tokioms, kurias likvi-



7.19 pav. **DNR pažeidimo laipsnis ir SOS atsako etapai**

duoja SOS atsakas, reikia laiko. Jeigu vyktų DNR sintezė ir ląstelė, kurioje nepašalintos DNR pažaidos, dalytųsi:

- pažaidos pasidaugintų,
- didėtų pažeidimas, nes dažniausiai tose vietose, kur yra nepašalinta DNR pažaida, po DNR replikacijos atsiranda trūkiai.

SOS atsakas įsijungia laipsniškai, didėjant DNR pažeidimui (7.19 pav.):

uvrA,B,C,D → recA-lexA → umuDC → → dinD

***UvrA,B,C,D* lygis**. Jeigu yra daug daugiau negu įprasta nukleotidų pažaidų, *uvrA,B,C,D* genai pradeda **veikti indukuotu režimu**. Antai *E. coli* ląstelėje konstitutyviai šių genų koduojamų baltymų yra tiek:

UvrA	UvrB	UvrC	
20	200	30	baltymo molekulių

Po indukcijos Uvr B ir Uvr C baltymų padaugėja 100–200 kartų.

Genai turi 2–3 promotorius. Vienas jų skirtas konstitutyviai, kiti – indukuotai geno veiklai.

***RecA-LexA* lygis**. Kai DNR pažeidimas didėja, atsiranda papildomų DNR trūkių, o šie yra signalas šiam lygiui įsijungti. Šio lygio genų veiklą valdo genų pora *recA-lexA*. Genas *lexA* koduoja baltymą-represorių LexA, kuris slopina indukuotą (bet ne konstitutyvią) SOS atsako genų veiklą.

Regulono valdymas sudėtingas. Būtinas ATP, kuris yra viena iš sąlygų pradėti regulonui veikti, bet ne vienintelis. Antras signalas – DNR trūkis, į kurį reaguoja *recA* geno koduojamas baltymas RecA.

RecA baltymas dalyvauja įvairiuose ląstelės vyksmuose, iš kurių svarbiausi genetinė rekombinacija (iš čia jo pavadinimas *rec*) ir įvairūs DNR reparacijos tipai, kuriuose susidaro ir užtaisomi DNR trūkiai. RecA baltymas yra polifunkcinis: jis

pažįsta DNR trūkius ir permeta DNR grandinės galą nuo vienos DNR molekulės ant kitos, DNR molekulėse jis gali padaryti D kilpą, t. y. atknoti DNR grandinę ribotoje jos dalyje.

Kai prie LexA baltymo prisijungia aktyvintas RecA baltymas, represorius LexA skyla pusiau ir nustoja slopinti SOS atsako genus (kurių *E. coli* yra bent 19). Konstitutyviai veikiančių genų veikla labai sustiprėja. Antai paties RecA baltymo *E. coli* ląstelėje yra 1500 molekulių. Po indukcijos jų skaičius padidėja 50 kartų.

SOS atsakas įjungia labai savitus genus žinduolių ląstelėse. Tai kolagenazės (kolagenas yra vienas iš ekranų odoje), metalotioneinų I ir II (jie suriša dvivalenčių ir trivalenčių metalų jonus), plazmogeno aktyvatoriaus (didėja kraujo nekrešėjimas), **protoonkogenus** *c-mos*, *c-fos*, *c-alb*. Vadinasi, įjungiami genai, kurie lems savęs susinaikinimą – vėžį. Taip pat įjungiami genai, lemiantys **autoimuninę ligą**. Tik neaišku, kokia šių genų aktyvinimo tvarka: ar jie įjungiami iš karto, ar laipsniškai, didėjant pažeidimui.

Mutageniškas *umu DC* lygis. Jis menkai ištirtas ir kaskart pasipildo naujais „veikėjais“, kurie galėtų būti net savarankiški, nepriklausyti regulonui. Tokie yra genai, kurie koduoja (arba valdo) DNR III polimerazės polipeptidą, atliekantį korekciją, ypatingą DNR I polimerazės formą (žymimą DNR I*polimerazė) ir pagaliau kol kas nepakankamai ištirtos paskirties DNR II polimerazę. Šios polimerazės sintezę reguliuoja ir SOS atsako genai. Po SOS indukcijos DNR II polimerazės sintezė padidėja 7 kartus.

Minėtų DNR polimerazių paskirtis – netiksliai, bet greitai užtaisyti DNR trūkius. Šis lygis įsijungia, kai pažaidų (DNR trūkių) daug ir svarbu bet kaip „užlopyti“ susidariusius plyšius. Genai *umuDC* sudaro labai nedidelį operoną. Pirmasis šio operono veiklos etapas gan gerai ištirtas: *umuD* genas koduoja represorių, slopinantį *umuC* geno veiklą. Kai šis represorius skyla pusiau, vienas polipeptidų, atvirkščiai, tampa *umuC* geno aktyvatoriumi. Genas *umuC* koduoja baltymą, slopinantį korekcinę DNR polimerazės funkciją.

***Din D* lygis** (angl. *damage inducible*) beveik netirtas. Matyt, DNR užlopoma suirusių DNR molekulių fragmentais.

SOS atsako mutageniškas lygis yra būdas totaliai, nediferencijuotai valdyti mutagenezę.

33. 1313

Reikia įsidėmėti, kad **mutacijų lygis yra genomo lemiama savybė**. Bakterijos *Deinococcus radiodurans* (buvęs pavadinimas *Micrococcus radiodurans*) gyvena labai rizikingoje, genotoksiškoje aplinkoje, pakelia labai dideles jonizuojančiosios spinduliuotės dozes, todėl rizika mutacijoms atsirasti yra labai didelė. Maža to, kad šių bakterijų ir *Micrococcus luteus* labai aktyvi ir stipri visa antimutagenezės sistema, *D. radiodurans* neturi *umuDC* genų.

Ir atvirkščiai, yra bakterijų, kurioms būtinas didesnis mutacijų lygis, kad greičiau galėtų prisitaikyti prie naujų aplinkos veiksnių. Tokios bakterijos papildomai turi plazmidžių (pvz., R46, pkM101 ir kt.), kuriose yra *umuDC* genų homologų (*mucA,B*).

Oksidacinio streso atsakas įdomus tuo, kad *E. coli* jį lemia **trys regulonai**. Dvi genų grupės susijusios viena su kita ir priklauso nuo oksidacinio streso stiprumo, panašiai kaip SOS atsako (tai *oxyR* ir H_2O_2 regulonai), o trečiasis regulonas, matyt, savarankiškas *SoX*, specialiai $O_2^{\bullet}$ laisvajam radikalui ir jo padariniams.

***OxyR* regulonas**. Jį sudaro bent 8 **ankstyvojo atsako** genai. Koduoja sintezę fermentų, kurie inaktyvina laisvuosius radikalus ir peroksidus (Mn-superoksiddismutazę, katalazę, hidroksiperoksidazę, glutationreduktazę ir kt.).

***H_2O_2* regulonas** lemia vėlesnį atsaką, kai jau atsiranda DNR ir baltymų pažaidos, kurias reikia šalinti. Regulone yra bent 21 genas, tarp jų genas, koduojantis **egzonukleazę III**. Taip iš pradžių buvo pavadintas šis fermentas, o iš tikrųjų jis yra **DNR glikozilazė-AP-endonukleazė** su papildomomis funkcijomis (polifunkcinis baltymas). Viena iš šių papildomų funkcijų yra egzonukleazės funkcija. Fermentas, kaip egzonukleazė, DNR trūkio vietoje šalina nereparuojamas DNR pažaidas. Šio fermento veiklą galime palyginti su chirurgo darbu, kuris pirma išvalo žaizdą, kad po to galėtų ją užsiūti.

***SoX* regulonas** yra pats stambiausias, apie 30 genų ir specialiai tik $O_2^{\bullet}$ ir jo daromoms pažaidoms. Pagrindinis DNR reparacijos fermentas – **endonukleazė IV**. Tai irgi nedidelis, bet polifunkcinis baltymas – **DNR glikozilazė-AP-endonukleazė.**

Šiluminio šoko atsakas įdomus dėl dviejų priežasčių.

Pirma, reparuojama ne tik DNR, bet ir baltymai, ląstelės struktūros (membranos). Aukšta temperatūra pirmiausia pažeidžia baltymus. Denatūruoti baltymai yra pirminis šio atsako signalas. Sparčiau (ant atsarginių mRNR) vyksta proteolizės fermentų sintezė.

Antra, šiluminio šoko regulonas buvo pirmasis, kurio labai smulkiai ištirta signalo pernaša nuo membranos paviršiaus vezikulėmis į branduolį. Taip buvo aptikti **šaperonai** – baltymai, kurių paskirtis atkurti tretinę baltymų sandarą. Jų yra keletas. Geriausiai ištirti Hsp70, Hsp60.

7.5.2.4. Nesuporuotų nukleotidų reparacija. Žmogaus DNR reparacijos defektai

Pastaruoju metu ypač domimasi DNR pažaidų reparacijos tipu, kuris vadinamas **nesuporuotų nukleotidų reparacija**. Susidomėta šiuo reparacijos tipu dėl dviejų priežasčių:

- bent du trečdaliai visų genų mutacijų yra klaidos, likusios po netikslios šio tipo nukleotidų reparacijos;
- aptiktas tiesioginis ryšys tarp nesuporuotų nukleotidų reparacijos ir vėžio.

Pastaruoju metu jau aptikti 5 žmogaus genai, kurie yra genų *mutH* ir *mutS* homologai, ir jų mutacijos arba metilinimo sutrikimai sukelia vėžį. Ryšys tarp vėžio atsiradimo ir nesuporuotų nukleotidų reparacijos labai gerai įsirašo į mutacinę vėžio teoriją.

Grįžkime prie mutacijų. Nukleotidų įjungimo tvarka į naujai sintetinamą grandinę yra gerai žinoma ir griežtai kontroliuojama:

- A jungiasi poroje su T, arba atvirkščiai, T su A,
- G jungiasi poroje su C, arba atvirkščiai, C su G.

Ši tvarka gali būti pažeista. Tada DNR molekulėje atsiranda netaisyklingos poros:

A•G, A•C, C•T ir kitos.

Nesuporuoti nukleotidai atsiranda DNR dėl keturių priežasčių:

- **netikslios** DNR polimerazių atliekamos **korekcijos**, nukleotidų įjungimo į sintetinamą DNR grandinę neištaisytų klaidų;
- **potencialių DNR pažaidų**: pažeistas nukleotidas gali neteisingai įsijungti **(įjungimo klaida)** arba prisijungti ne tą nukleotidą **(replikacijos klaida)**;
- **heteroduplekso**, kuris susidaro peršokant DNR grandinei nuo vienos molekulės ant kitos; paprastai tai įvyksta dėl genetinės **rekombinacijos**;
- deamininant **metC**, šis virsta T:

$$\text{metC} \xrightarrow{\text{deamininimas}} \text{T}$$

Nesuporuotų nukleotidų reparacija ir mutagenezės valdymas. Dažniausiai nesuporuoti nukleotidai atsiranda dėl klaidų naujai sintetinamoje

DNR grandinėje. Nesvarbu, ar būtų apsirikusios DNR polimerazės, įjungdamos nukleotidą į polinukleotidinę grandinę, ar klaida būtų atsiradusi dėl potencialių DNR pažaidų, **klaida turi būti ištaisyta.** Kai to nepajėgia atlikti DNR polimerazė, tai atlieka specialus klaidingai jungiamų, nesuporuotų nukleotidų reparacijos (angl. *mismatch repair*) tipas.

Klaidos gali būti paliekamos neištaisytos specialiai, kad atsirastų daugiau mutacijų. Ir atvirkščiai, pagerėjus klaidų taisymui, mutacijų dažnis gali labai sumažėti. Tai vienas iš būdų totaliai valdyti mutacijų dažnį. Todėl daugelio nesuporuotų nukleotidų reparacijos genų mutacijos yra **mutatoriai** – padidina mutacijų dažnį ir žymimos simboliu ***mut***. Antai genų *mutS*, *mutL*, *mutH* mutacijos padidina *E. coli* mutacijų dažnį 100–1000 kartų.

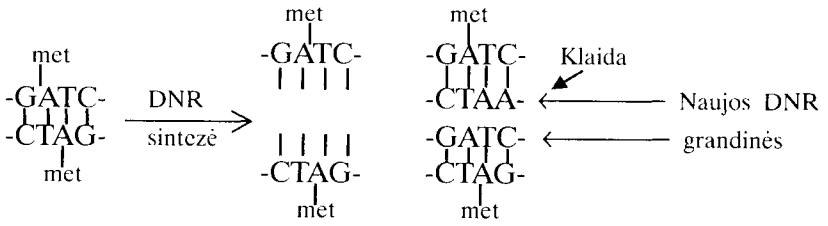
Dam-valdoma reparacija. Neteisingai įjungtą nukleotidą (įjungimo arba replikacijos klaidas) šalina baltymų kompleksas, kurio pagrindiniai veikėjai yra MutS, MutH, MutL.

Nesuporuotų nukleotidų reparacija išsiskiria iš kitų DNR reparacijos tipų tuo,

- kad **reikia ne tik aptikti pažaidą**, šiuo atveju – nesuporuotus nukleotidus,
- bet ir **nustatyti, kuri DNR grandinė yra senoji (teisinga), o kuri naujoji** (joje buvo padaryta klaida).

Suprantama, kad neatitinkantis nukleotidų porų sudarymo taisyklės nukleotidas yra pašalinamas iš naujosios grandinės.

Kaip atskirti, kuri grandinė senoji ir kuri naujoji? Daugelyje organizmų gamta dar kartą pasinaudojo DNR metilinimu, šįsyk naujajai DNR grandinei atskirti nuo senosios. Būtent metilinimu, kurį atlieka Dam-metilazė. Ši DNR modifikacija atliekama po DNR replikacijos. Bet, pasibaigus DNR sintezei, senoji grandinė jau būna metilinta. Naujai metilinti reikia būtent naująją DNR grandinę:



E. coli MutS ir MutH baltymai pažįsta metilintą nukleotidų seką $-G\overset{met}{A}TC-$ ir atskiria naująją grandinę nuo senosios:

- senoji – metilinta,
- naujoji – nemetilinta.
- nesuporuotas nukleotidas pašalinamas iš nemetilintos DNR grandinės.

MutS baltymas – pagrindinis nesuporuotų nukleotidų pažinimo baltymas. Jis pažįsta visas 8 įmanomas netaisyklingas nukleotidų poras ir jungiasi su artimiausia tokiai porai GATC seka. MutH baltymas yra endonukleazė. Ji kerpa DNR nemetilintoje GATC sekoje 5′ prie G arba 3′ prie A (7.20 pav.):

MutS sudaro papildomus kompleksus ir su kitais baltymais. Būtinosios komplekso sudėtinės dalys dar yra MutH=uvrD helikazė, SSB baltymas, kai kurios egzonukleazės, DNR I arba II polimerazės, ligazė, būtinas energijos išteklius – ATP. *E. coli* galutinai susidaro vienagrandis trūkis, kuris užtaisomas „klasikiniu" ekscizinės reparacijos būdu.

Tad įvairios DNR reparacijos sistemos veikia kaip **vieninga visuma**.

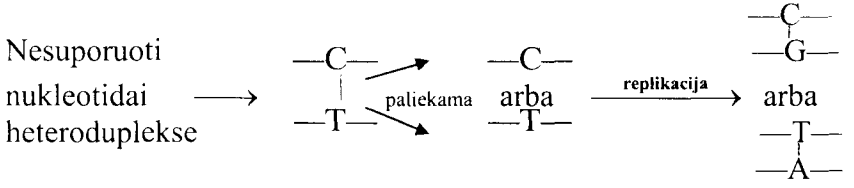
Nesuporuoto T pašalinimas. Tai labai pavojinga pažaida. Kaip minėta, ji atsiranda dėl metilinto citozino deamininimo:

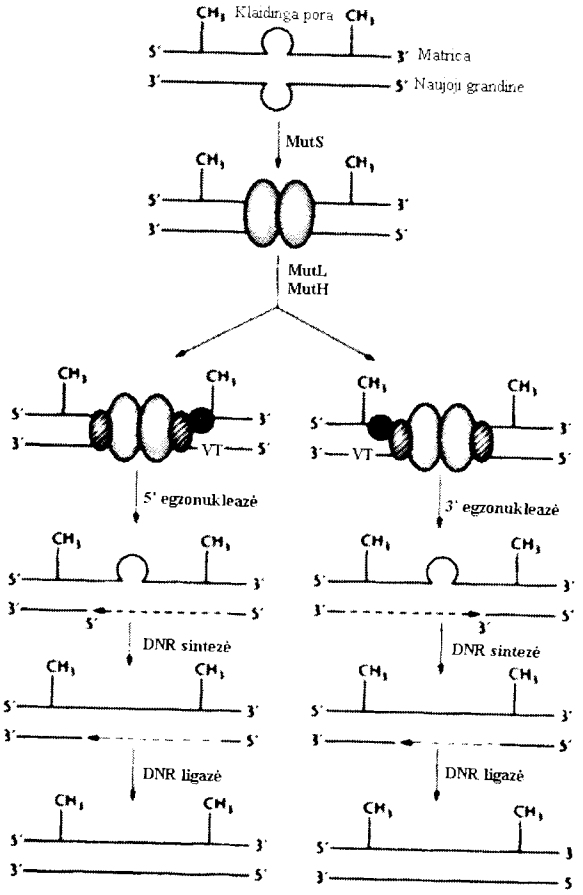
$$metC \xrightarrow{\text{deamininimas}} T.$$

Tai vyksta poroje **metC-G**, ir vietoj jos atsiranda nesuporuoti nukleotidai **TG**. Jeigu šis T būtų nepašalintas, jau kitoje DNR replikacijoje vietoj poros C-G atsirastų pora T-A. Baltymas MutS kartu su kitais baltymais pašalina ir šią klaidą.

Heteroduplekso korekcija. Heteroduplekas yra dviejų DNR molekulių „hibridas"– didesnė ar mažesnė atkarpa iš vienos ir kitos DNR molekulių grandinių. Tai DNR rekombinacijos produktas. Abi DNR grandinės heteroduplekso vietoje yra senos. Vienas alelis skiriasi nuo kito, todėl heteroduplekso vietoje atsiranda nesuporuotų nukleotidų.

Kol kas nenustatyta, kad būtų suteikiama pirmenybė kuriai nors DNR grandinei heteroduplekse, ir todėl klaida ištaisoma atsitiktinai, pvz.:





7.20 pav. ***Escherichia coli*** **nesuporuotų nukleotidų reparacija:** MutS – didelis ovalas, MutL – užbrūkšniuotas ovalas, MutH – tamsus skritulėlis; MutS atpažįsta klaidingą porą ir metilinimo seką GATC; MutH kerpa grandinę, atsiranda vienagrandis trūkis (VT), VT platina egzonukleazė (pagal J. J. Pasternak, 1999)

Štai kodėl vyksta geno konversija. Dėl atsitiktinės heteroduplekso korekcijos vienas alelis virsta kitu:

$A \rightarrow a$ arba atvirkščiai, $a \rightarrow A$.

Mikrosatelitai, nesuporuotų nukleotidų reparacija ir vėžys. Per laimingą atsitiktinumą labai lengvai nustatytas ryšys tarp mikrosatelitų ir nesuporuotų nukleotidų reparacijos. Pasisekė, kad nepapilominis storosios žarnos vėžys vystėsi dėl mikrosatelito (nedidelės paprastųjų kartotinių sekų sankaupos) pačiame žmogaus nesuporuotų nukleotidų reparacijos gene *hMSH 2*. Šis genas yra *E.coli* geno *mutS* homologas. **Apskritai mikrosatelitai skatina netikslią DNR replikaciją, atsiranda daug netaisyklingų nukleotidų porų.**

Ir kai kurie mutagenai sukelia mutacijas silpnindami tikslų nukleotidų įsijungimą į naują DNR grandinę, slopindami DNR polimerazės korekcinę funkciją. Tai būdinga kai kuriems dvivalenčiams bei trivalenčiams metalų jonams, ypač mangano. Tiriant šio mutageno veikimą ir apskritai pirmą kartą aptikta klaidinga DNR replikacija.

DNR reparacijos defektų reikšmė paveldimoje žmogaus patologijoje yra nepalyginami didesnė, negu iki šiol manyta. Pabandykime tai pamatuoti.

Pirma, akivaizdu, kad naujos mutacijos lytinėse ar somatinėse ląstelėse gali atsirasti tik tada, kai slopinama DNR pažaidų reparacija. Vadinasi, vėžys tiesiogiai ar netiesiogiai yra DNR reparacijos defektas. Net tada, kai žinoma, kad vėžį nulėmė vėžio supresorių – antionkogenų ar onkogenų genų mutacijos.

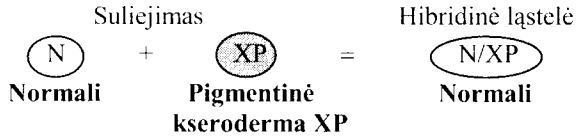
Antra, labai daug ligų, net ne genotipinės kilmės, pvz., infekcinės ir su jomis susiję uždegiminiai procesai, slopina reparaciją.

Trečia, yra labai daug ligų, kurių pirminės priežastys kol kas neaiškios. Jos jungiamos į bendrą grupę vien pagal fenotipinį poveikį. Tik geriau ištyrus įsitikinama, kad tai reparacijos geno poveikis. Taip atsitiko ir ***hMSH-2*** genui, kuris turi ir antrą pavadinimą *HNPCC* (nuo nepapilominio storosios žarnos vėžio). Dabar aišku, kad tai DNR reparacijos genas ir kad jo defektas sukelia ne tik storosios žarnos, bet ir kitas vėžio formas: plaučių, kepenų, ryklės, gimdos kaklelio, kiaušidžių ir kt.

7.21 pav. **Pigmentinė kseroderma**

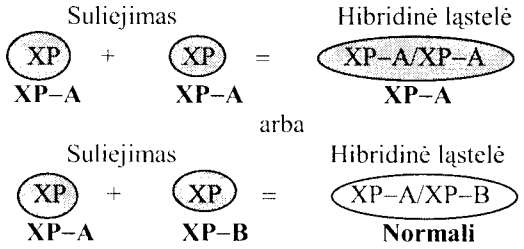
Lygiai tokia pati istorija daugelio kitų šiuo metu žinomų ligų, kurių pirminė priežastis yra DNR reparacijos genų mutacijos. Daugeliu atvejų jos kaip DNR reparacijos defektai aptiktos pagal jautrumą UV spinduliuotei. Taip atsitiko ir **pigmentinėms kseroderma** (pigmentuota, sausa oda, 7.21 pav.). Tai pusiau letalios recesyvinės ligos, pereinančios į odos vėžį. Ligonis gali apakti. Nukenčia atviros kūno dalys, kurios tiesiogiai kontaktuoja su UV.

Tik fenotipiškai, pagal jautrumą UV pigmentinės kserodermos panašios. Iš tikrųjų tai bent 8 skirtingų nealelinių genų mutacijos. Šitai nustatyta **komplementacijos testu**, kurį galima taikyti ir žmogui somatinių ląstelių hibridizacijos metodu. Suliejus sergančiojo pigmentine kseroderma odos ląsteles (fibroblastus) su normaliomis žmogaus odos ląstelėmis, kaip ir buvo galima tikėtis, pasireiškė **dominavimas**, ir hibridinė ląstelė buvo normalaus fenotipo.



Šiuo reiškiniu pasinaudota genų terapijoje.

Tačiau suliejus įvairių asmenų, sergančių pigmentine kseroderma, ląsteles, rezultatas gautas dvejopas:



Taigi kol kas aptiktos 8 pigmentinės kserodermos komplementacijos grupės, o tai reiškia, kad pigmentinę kserodermą lemia bent 8 nealeliniai, savarankiški *XP* genai, kurie yra skirtingose žmogaus chromosomose (9, 8, 2, 5, 19, 15, 13). Bet kurio jų mutacija gali būti pigmentinės kserodermos priežastis. Lemia DNR ekscizinę reparaciją (žr. 7.18 pav., *II*).

Panašiai išaiškintos ir **Fankonio mažakraujystės** (bent 4) ir **Kokeino sindromo** (bent 2) komplementacijos grupės ir nealeliniai genai, koduojantys skirtingus DNR reparacijos fermentus. Kokeino sindromo genai *CSA* ir *CSB* būtini aktyvių, transkribuojamų genų reparacijai. Sergantys Fankonio anemija ypatingai jautrūs ne tik UV, bet ir laisviesiems radikalams ir mutagenams, kurie sukelia tarpgrandines DNR sąryšas.

Genetiškai ypač įdomus DNR reparacijos defektas, pasireiškiantis kaip **ataksija-telangiektazija**. Nors nustatytos bent 4 komplementacijos grupės, ligą lemia tik vienas genas *ATM* (11q22-23). Pasireiškia tarpalelinė komplementacija geno viduje tarp skirtingų šio geno funkcinių dalių. Sergantys šia liga ypač jautrūs rentgeno spinduliams, net dozėms, kurios naudojamos diagnozuojant. Liga pasireiškia sutrikusia judesių koordinacija, kapiliarų išsiplėtimu ir kt.

Bliūmo sindromas ypatingai retas, bet genas *BLM* (15q26.1) yra gerai ištirtas. Jis koduoja baltymą, homologinį *E. coli* RecQ helikazei. Įdomu, kad BLM ligonių ląstelėse sumažėjęs aktyvumas net kelių DNR replikacijai ir reparacijai svarbių fermentų, tarp jų DNR I ligazės, II topoizomerazės, timidilatsintetazės, uracilDNR glikozilazės, N-metilpurin DNR glikozilazės, O^6-metilguanin metiltransferazės, SOD, todėl ligoniai ypatingai jautrūs UV ir alkilinančiosioms medžiagoms, jų ląstelėse labai daug seserinių chromatidžių mainų, kvadriradialinių chromosomų.

Kitas bendro pobūdžio požymis, pagal kurį atrenkami reparacijos genų defektai, – **ankstyva senatvė** (progerijos – Hačisono-Gilfordo sindromas, Vernerio liga; 7.22 pav.). Šiomis ligomis sergančiųjų genome nustatytas dar vienas DNR reparacijos defektas: sąryšų „DNR-baltymas“. Kaip vyksta šių pažaidų reparacija, apskritai neaišku. Galbūt modeliniai eksperimentiniai gyvūnai, imituojantys Vernerio ar Hačisono-Gilfordo sindromus, padės ištirti šio tipo pažaidų reparaciją.

7.6. Dirbtinis ir gamtinis mutagenezės valdymas

Dirbtinai valdoma mutagenezė. Prieš kokius 35 metus tai būtų fantastinis klausimas. Atrodė, kad nėra jokios teorinės prielaidos valdomai mutagenezei, juo labiau gamtinei vykti. Paradoksas tas, kad tuo metu jau buvo tiriami reiškiniai, kurie yra tiek dirbtinės, tiek natūraliai valdomos mutagenezės pamatas:

- nustatytas mutagenų veikimo savitumas;
- pradėtas tirti genetinio nestabilumo reiškinys, jo priežastys – judrieji genomo elementai, DNR replikacijos ir reparacijos defektai;
- mutagenezė naudojant transformuojančią DNR.

Ypač sėkminga buvo pastaroji kryptis. Išskirta iš donoro transformuojanti (sukelianti bakterijų transformaciją, žr. p. 542) DNR buvo paveikiama mutagenais, paskui ši DNR buvo įterpiama į bakterijos chromosomą. Buvo gaunamos įvairios vieno geno (kuris buvo naudojamas kaip transformacijos žymeklis) mutacijos.

7.22 pav. **Ankstyvoji senatvė (progerijos):**
kairėje – Vernerio sindromas: *A* – 48 m. amžiaus moteris; *B* – ta pati moteris, kai jai buvo 10 metų (C. J. Epstein et al., 1966); dešinėje – Hačisono-Gilfordo sindromas, 17 m. amžiaus vyras (iš H. Gilford, 1904)

DNR transformacija sudarė sąlygas atsirasti genų inžinerijai, o mutagenezė transformuojančia DNR – saitspecifinei mutagenezei.

Saitspecifinė mutagenezė – tai dirbtinai valdoma mutagenezė. Įvairiais genų inžinerijoje taikomais būdais (tarp jų ir dirbtinės DNR sintezės) gene

- nukleotidas (arba nukleotidų seka) keičiamas kitu;
- pašalinamas nukleotidas arba nukleotidų seka (tai delecijos);
- įterpiamas naujas nukleotidas arba nukleotidų seka.

7.6.1. Mutagenų veikimo savitumas

Nėra mutagenų, kurie sąveikautų tik su konkrečiu genu, nes paskiras genas sudarytas iš tų pačių nukleotidų, kaip ir kiti genai, ir kiekviename gene to paties mutageno sąveika su nukleotidais bent teoriškai vyksta vienodai. Tačiau, kaip galima buvo įsitikinti, įvairių mutagenų daromos DNR pažaidos yra specifinės; tai ir nulemia mutagenezės specifiškumą (savitumą).

Mutagenezės savitumas pasireiškia įvairiai.

1. Mutagenas gali indukuoti tik kurio nors vieno tipo (genomo, chromosomų, genų) **mutacijas** arba vieno tipo mutacijų sukelia daugiau, kitų tipų – mažiau. Pavyzdžiui, 1,4-bisdiazoacetilbutanas indukuoja tik taškines, o kolchicinas – tik genomo mutacijas. Jonizuojančioji spinduliuotė indukuoja daugiau chromosomų ir genų mutacijų. Šį savitumą nulemia daugiausia tai, kad skirtingi mutagenai atakuoja skirtingus „taikinius". Kolchicinas – tik achromatinės verpstės baltymus, todėl neišsiskiria dukterinės chromosomos.

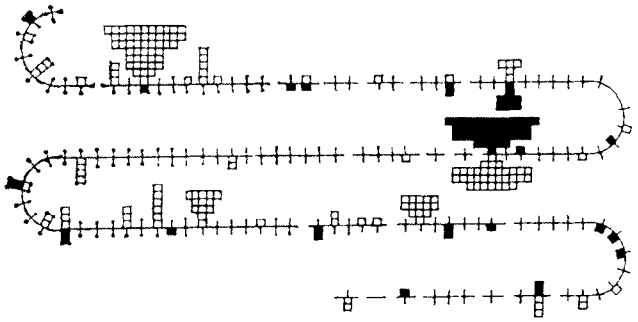
2. Įvairūs mutagenai to paties tipo mutacijų daugiau sukelia skirtinguose lokusuose. Antai *Neurospora crassa* brometilmetansulfonatas sukelia reversijas iš *ade*$^-$ į *ade*$^+$ (adenino sintezė) 3800 kartų dažniau negu iš *inos*$^-$ į *inos*$^+$ (inozito sintezė), o paveikus grybą UV, net atvirkščiai, mutacijos iš *inos*$^-$ į *inos*$^+$ dvigubai dažnesnės už mutacijas iš *ade*$^-$ į *ade*$^+$.

3. Tame pačiame gene skirtingi mutagenai sukelia įvairias genų mutacijas. Klasikinis daug kartų minėtas pavyzdys – akridino dažai, kuriais indukuojamos tik skaitymo rėmelio poslinkio mutacijos. Alternatyva – alkilinančiosios medžiagos, sukeliančios tik pakaitas.

4. Mutagenų savitumas pasireiškia pagal skirtingus „karštus taškus". Tai chromosomos arba geno vietos, kuriose mutacijų būna itin daug. Geriausia juos paaiškinti pavyzdžiu, kaip pasiskirsto bakteriofago T_4 *r II* cistrone *B* (7.23 pav.) gamtinės ir UV sukeltos mutacijos.

Dauguma gamtinių mutacijų vyksta keliuose saituose (vietose). Kitose šio cistrono vietose gamtinių mutacijų aptinkama nedaug. Tos vietos, kurios labai dažnai pakinta, ir yra „karšti taškai". Apšvitinus UV, cistrone *B* atsiranda trys nauji „karšti taškai", nebūdingi gamtinėms mutacijoms.

Trijų (2, 3, 4) mutagenų savitumo apraiškų priežastis bendra: įvairūs mutagenai nevienodai pažeidžia G-C ir A-T nukleotidų poras, kurios gene (taip pat įvairiuose genuose ir net chromosomose)



7.23 pav. **„Karšti taškai" bakteriofago T4 *rIIB* cistrone:**
UV ir spontaninių mutacijų dažnių palyginimas: šviesūs langeliai – UV indukuotos, tamsūs langeliai – spontaninės mutacijos; langelių skaičius rodo mutantų dažnį saite

pasiskirsčiusios netolygiai. Suprantama, alkilinančiosios medžiagos labiau atakuos tuos genus ir tas vietas gene, kur daugiau susikaupę G-C porų, o UV, – kur DNR molekulėje yra daugiau pirimidinų.

Tai pagrindinė, bet ne vienintelė mutagenų savitumo priežastis. Lemia ir visi tie veiksniai bei reiškiniai, kurie vyksta po to, kai atsiranda DNR pažaida. DNR pažaidų reparacija nevienodai sėkmingai pašalina įvairias DNR pažaidas. O „sietai", kurie nepraleidžia naujų mutacijų III mutagenezės etape, nevienodai atsijoja įvairias mutacijas. Šių sietų veikla labai priklauso nuo įvairių aplinkos ir vidinių veiksnių, individualios raidos (7.5 lentelė).

Štai kodėl mutagenas pažeidžia daugiau vieno kurio organo – audinio ląstelių genomą ir vystosi atitinkamo organo – audinio vėžys.

7.5 lentelė. **Mutacijų dažnis ir spektras švitinant jonizuojančiaisiais spinduliais miežius, esančius įvairiuose raidos etapuose** (pagal N. Batyginą, 1980)

Raidos etapai spinduliuotės metu	Mutacijų dažnis %	Chlorofilinės ir sterilios	Morfologinės ir fiziologinės	Gyvybingų mutacijų %
		mutacijos %		
Sėklos	**11,09±0,47**	**10,77**	0,32	**2,91**
II etapas	1,73±0,31	1,10	**0,63**	37,03
IV etapas	1,87±0,35	1,68	0,19	10,34
VI etapas	1,45±0,31	0,94	**0,51**	35,00

Tą patį geną įvairiose chromosomos vietose nevienodai atakuoja mutagenai. Tuo įsitikinta *Escherichia coli lac* operono genus perkėlus į įvairias chromosomos vietas. Tas pats *lac* lokusas, paveiktas tuo pačiu mutagenu, įvairiose chromosomos vietose mutavo skirtingu dažniu.

Šiuolaikinė genetika pribrendo paaiškinti ir šį reiškinį. Jis siejamas su dviem genomo ypatybėmis, nuo kurių priklauso DNR reparacijos sėkmė:

- nuo chromatino sandaros (tai būdinga eukariotams),
- nuo genų raiškos (ekspresijos).

Prisiminkime, kad intensyviausiai vyksta aktyvių (ekspresuojamų) genų DNR reparacija. Pastaruoju metu šiuo reiškiniu itin domimasi. Pats įdomiausias mutagenezės reiškinys, lemiantis ir mutagenų savitumą, mutagenezės priklausomybė nuo konteksto.

Mutagenezės priklausomybė nuo genetinio konteksto. Mutageno aktyvumas priklauso nuo to, kokie nukleotidai yra šalia to nukleotido, su kuriuo sąveikauja mutagenas. Tai pirmasis pastebėjo Kochas (R. Koch). Buvo įrodyta, kad, pavcikus 2-aminopurinu bakteriofago T_4 *rII* mutantus, reversijų dažnis pirmojoje nonsenso nukleotidų poroje priklauso nuo antrojo ir trečiojo nukleotidų. Kai antroji nukleotidų pora nonsense yra ne A-T, o G-C, (palygintas reversijų dažnis nonsensuose UAA ir UGA), reversijos 20 kartų dažnesnės. Kai trečiojoje nonsenso nukleotidų poroje vietoj A-T yra G-C (lyginti nonsensai UAA ir UAG), reversijų dažnis pirmojoje nukleotidų poroje padidėjo tris kartus.

Konteksto reiškinys **kategoriškai prieštarauja požiūriui**, kad trečiojo nukleotido mutacija kodone yra nereikšminga – **neutrali.**

7.6.2. Gamtinis mutagenezės valdymas. Genetinis nestabilumas. Genai-mutatoriai ir antimutatoriai

Populiarioji spauda mutacijas pavertė ekologiniu baubu. Iš tikrųjų kiekvieno taksono genome yra nusistovėjęs labai subtilus santykis tarp mutagenezės ir antimutagenezės. Prisiminkime mutageninę DNR reparaciją, kurią lemia *umuDC* genai. Bakterijos *Deinococcus radiodurans*, kurios gyvena labai genotoksiškoje aplinkoje, šių genų genome apskritai neturi. Tos bakterijos, kurios polimorfinės, atvirkščiai, turi papildomus *umu DC* genų homologus plazmidėse.

„Mutacijos pagal užsakymą“– reiškinys aptiktas gamtinėse drozofilos populiacijose. Pasirodo, drozofilos populiacijose yra tikros mutacijų „mados“: vienais metais aptinkama daug mutacijų *white* (baltos akys), kitais – *abnormal abdomen* (nenormalus pilvelis) ir t. t. Mutacijos atsiranda, kai tik jų prireikia. Antai mutacija *white* sąlygoja didesnį atsparumą aukštai temperatūrai, todėl kai aplinkoje karšta, ši mutacija gana dažna. **Tai užprogramuota *white* geno sandaroje**. Šis genas turi labai ilgą reguliacinę (valdymo) dalį, kurioje yra daug judriųjų genomo elementų įsiterpimo vietų. Bet kurioje *white* geno vietoje įsiterpus judriajam ganomo elementui, įvyksta normalaus alelio (*White)* mutacija. Bet ji nėra *nul*, o *leaky* tipo – genas nėra visiškai slopinamas, nes judrusis elementas gali įsijungti tik į reguliacinę geno dalį. Jo koduojančioji dalis lieka nepakitusi. Vis dėlto šioje *white* lokuso mutacijų valdymo grandinėje trūko labai svarbios grandies: kaip valdomas judrusis genomo elementas, kas ir kada jam „sukomanduoja“ įsiterpti į *white* lokusą. Tik 1993 m. pagaliau pavyko šį klausimą išspręsti grupei Rusijoje (Novosibirske) dirbančių mokslininkų, vadovaujamų V. Ratnerio. Signalas judriesiems genomo elementams įsiterpti į *white* lokusą yra aukšta temperatūra, šiluminio šoko atsako indukcijos sąlygos. Jos sukelia judriųjų elementų transpoziciją (judėjimą į kitą vietą). Pagaliau paskutinis veikėjas – **atranka**. Tie judrieji genomo elementai, kurie įsiterpia į *white* lokusą (FB, *copia* ir kt.), gali įsiterpti ir į kitus lokusus. Tačiau aplinkos veiksnys – ta pati aukšta temperatūra, kuri buvo signalas pradėti judėti judriesiems genomo elementams, yra ir atrankos veiksnys.

Atrenkamos tik tos mutacijos, kurios sąlygoja prisitaikymą prie aukštos temperatūros, vadinasi, *white*.

Gamtinė atranka mutacijoms, kaip atsitiktiniam reiškiniui, suteikia kryptingumą.

Šio tipo valdomos mutagenezės įvykių grandinė yra tokia:

Genas, kuris turi judriųjų elementų įsiterpimo vietas + **Judrieji elementai kitose genomo vietose** —*Aplinkos veiksnys. Signalas pradėti transpozicijai*→ **Judrusis elementas įsiterpia į geną** —*Transpozicija*→

Geno (ir papildomai kitų lokusų) **mutacija** —*Tas pats aplinkos veiksnys. Atrankos veiksnys*→ ***Atranka* tik tų mutacijų, kurios lemia *prisitaikymą* transpoziciją sukėlusiam *aplinkos veiksniui***

Yra kelios dešimtys nestabiliųjų drozofilos lokusų, tokių kaip *white,* paklūstančių „mados“ reikalavimams, ir kurių atsiradimas sietinas su ekologiniais veiksniais. Tai *yellow* (geltonas kūnas), *singed* („apsvilinti“ šereliai), *bithorax* (du toraksai ir dvi poros sparnų) ir kt. Svarbu nustatyti ne tik nestabiliuosius lokusus, bet ir tai, kokia mutacijų šiuose lokusuose biologinė – prisitaikomoji reikšmė. Ją nustatyti nėra lengva.

Genetinis nestabilumas. Nestabiliuosius genus ir genetinio nestabilumo reiškinį 1931 m. atrado Demerecas (M. Demerec), tirdamas augalą pentinių (*Delphinium ajacis*) ir drozofilą.

Genai, kurie mutuoja neįprastai dažnai $1 \cdot 10^{-2}$–$1 \cdot 10^{-3}$, vadinami **nestabiliaisiais**, o pats reiškinys – **genetiniu nestabilumu.**

Šiuo metu genetinis nestabilumas suprantamas žymiai plačiau. Skiriamas

- **genomo nestabilumas,** dažniausiai vertinamas pagal sutrikusias homologinių chromosomų dalybas, dažną aneuploidiją ir poliploidiją;
- **chromosomų nestabilumas,** nustatomas pagal dažnus chromosomų struktūros pokyčius (chromosomų aberacijas, seserinių chromatidžių mainus ir kt.), savitos jo apraiškos yra chromosomų lūžumas ir lūžūs chromosomų saitai (vietos);
- **geno nestabilumas,** apibūdinamas pagal dažnas kurio nors konkretaus geno mutacijas.

Iš karto reikia pateikti ir genetinio nestabilumo reiškinių skirstymą kitu atžvilgiu: genų, kaip ir chromosomų, nestabilumas gali būti bendrasis ir lokalusis.

Bendrąjį genetinį nestabilumą lemia mutageniška DNR pažaidų reparacija, *umuDC* genai, DNR replikacijos, reparacijos, rekombinacijos ir šiuos tris vyksmus valdančių genų mutacijos, judrieji genomo elementai, kai vyksta jų intensyvi transpozicija į įvairius lokusus, taip pat juos valdančių genų mutacijos.

Visų suminėtų genų mutacijos labai padidina mutacijų dažnį, todėl šie mutantiniai genai vadinami **mutatoriais**. Juos 1937 m. taip pat atrado Demerecas. Kai kurių genų pavadinimas kilęs nuo mutatoriaus: *mutH*, *mutS*, *mutY* ir kt. *E. coli* genai. Mutatoriai padidina mutacijų dažnį nuo kelių iki dešimčių tūkstančių kartų. Ypač stiprūs mutatoriai yra tie, kurie slopina tikslią, be klaidų, DNR replikaciją.

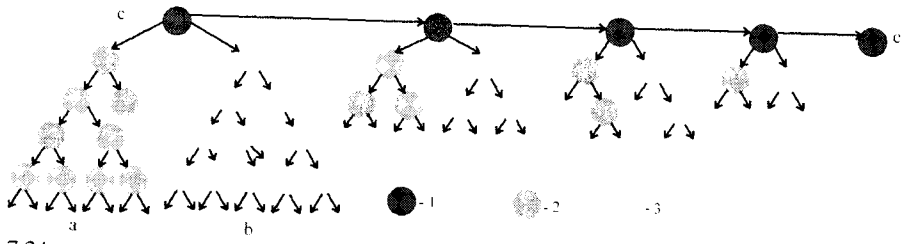
Pastaruoju metu bendrojo genetinio nestabilumo priežasčių gerokai pagausėjo dėl reiškinių, kurie vyksta mutagenezės I ir II etapais. Genetinis nestabilumas gali atsirasti ir dėl mutacijų genuose, kurie koduoja

- antimutagenų sintezę,
- mutagenų metabolizmo fermentus,
- ląstelės membranų pralaidumą. Tokios yra *E.coli* mutacijos *mrvA* ir *mrvB*.

Lėtinių uždegimų tyrimai papildė nestabilumą visiškai nauju – epigenetinio nestabilumo tipu. Teko genetinį nestabilumą suskirstyti dar vienu, paveldėjimo atžvilgiu į **genotipinį** ir **epigenetinį.**

Epigenetinis nestabilumas su paveldimumu susijęs netiesiogiai, tiek, kiek, pvz., yra paveldimas polinkis į lėtinius uždegimus. Itin svarbus **lokalusis genetinis nestabilumas.** Taip valdomas vieno konkretaus geno mutacijų atsiradimas. Nestabilieji genai yra lokaliojo nestabilumo pavyzdys. Tarp palikuonių atsiranda trijų tipų organizmai: stabilūs mutantai, stabilūs nemutantai, t. y. revertantai į pradinį tipą, ir nestabilūs mutantai (7.24 pav.), kurių nestabilumas perduodamas palikuonims, todėl jis kartais dar vadinamas replikuojamuoju genetiniu nestabilumu. Mutagenai gali sukelti įvairių tipų genetinį nestabilumą (7.25 pav.).

Nestabilieji genai atsiranda dėl kelių priežasčių: genų sandaros ypatumų, judrųjų genomo elementų, dėl mikrosatelitų, dažniausiai netranskribuojamose geno dalyse, epigenetinių reiškinių.



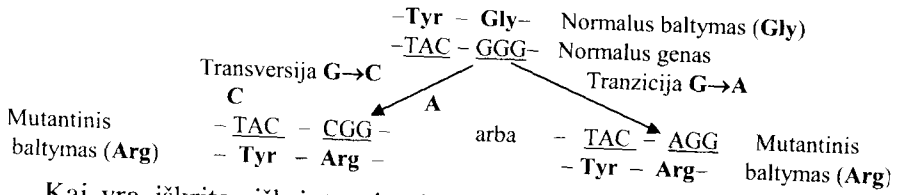
7.24 pav. **Replikuojamojo genetinio nestabilumo paveldėjimas:**
a – stabilaus mutanto atsiradimas; *b* – stabilaus revertanto atsiradimas (grįžimas į pradinį tipą); *c* – replikuojamasis nestabilumas; *1* – nestabilus mutantas, *2* – stabilus mutantas, *3* – stabilus revertantas

7.25 pav. **Lubinų genetinio nestabilumo indukcija aziridino (etilenimino) ir EDTA mišiniais:**
nestabilumas pagal nevienodą sėklų luobelės margumą ankštyje ir apskritai; pradinės sėklos buvo baltos

Prisiminkime, kad ir genai, kurių negalima pavadinti nestabiliaisiais, mutuoja įvairiu dažniu. Žmogaus ypač mutabilūs yra neurofibromatozės (dauginiai nervo skaiduliniai navikai), achondroplazijos (kremzlės distrofija), Hantingtono (arba progresuojančiosios chorėjos) ligos, Diušeno raumenų distrofijos genai.

Diušeno raumenų distrofijos genas yra pats **didžiausias** žmogaus genas. Jo dydis – per 2000 kb, o koduojamosios mRNR – 14 kb. Jis turi per 60 egzonų.

Didesnį mutabilumą galima būtų sieti ir su geno dydžiu: kuo didesnis genas, tuo didesnė tikimybė jei ne vienam, tai kitam nukleotidui mutuoti. Tačiau nustatyta, atrodytų, tikrai neįtikėtinas dalykas. Mutacijos Diušeno raumenų distrofijos gene (bent jų dauguma), tiek iškritos, tiek pakaitos, sutelktos nedidelėje 4 nukleotidų sekoje. Kai yra pakaita, mutantiniame baltyme vietoj glicino yra argininas:



Kai yra iškrita, iškrinta citozinas tirozino kodone. Reiškinys siejamas su **CpG salele**, kuri yra **Tyr-Gly** kodonų sandūroje:

TAC-GGG

Chromosomų nestabilumas. Kol kas nustatyti trys chromosomų nestabilumo tipai:

- **chromosomų lūžumo sindromai**; tai DNR reparacijos defektai (Fankonio mažakraujystė, Bliūmo sindromas, ataksija–telangiaktazija);
- **silpnas chromosomų nestabilumas** palyginti dažnas; visos ligos, sukeliančios sutrikusią laisvųjų radikalų pusiausvyrą, gali būti priskiriamos šiam tipui;
- **lūžūs saitai** (vietos); bent viena jų atsiradimo priežasčių jau aiški. Tai **mikrosatelitai** – paprastųjų kartotinių sekų sankaupos, kai jos viršija normalų kartotinių sekų skaičių (žr. p. 135 ir 3.3 lentelę). Šiose sankaupose gali būti ir CpG salelių, be to, pakartotų daug kartų, pvz., lūžioje vietoje fra X 27.3 $(CGG)_n$; čia n – iki 500 kartų.

Chromosomų lūžumo sindromai ir silpnas chromosomų nestabilumas yra bendro pobūdžio, o lūžūs saitai – lokalinis nestabilumas.

Ateities reiškiniai. Aptikta ir kol kas nepaaiškinamų valdomos mutagenezės reiškinių. Tai jau minėtos paramutacijos ir paveldimas polinkis į chromosomų mutacijas. Antrojo reiškinio pavyzdys – filadelfinė chromosoma. Tai abipusė translokacija tarp 22-osios ir 9-osios chromosomų, lemianti leukozę. Tačiau translokacija vyksta tik kamieninėse kraujo forminių elementų ląstelėse; kitose asmens ląstelėse šios chromosomų mutacijos nėra. Kariotipas atrodo normaliai.

7.7. Morfozės ir teratogenai. Genotrofai. „Įgytų požymių“ paveldėjimo klausimas

Talidomido skandalas ir jo pamokos. Šiame skyrelyje nebus nagrinėjami tie veiksniai, kurie sukelia prisitaikomojo pobūdžio modifikacijas – adaptacijas, o tik tie veiksniai, kurie sukelia organizmo raidos sutrikimus, nepaveldimus apsigimimus – morfozes. Kaip minėta, jų svarba tapo itin akivaizdi po Černobylio AE avarijos ir po kelių skandalų dėl naujų vaistų. Garsiausias skandalas – dėl talidomido. Jis buvo rekomenduotas nėščioms moterims kaip skausmą malšinantis vaistas. Vaistą vartojusios moterys gimdė vaikus įvairiai neišsivysčiusiomis galūnėmis (7.26 pav.). Daliai vaikų buvo pakitusi išorinė ausis, pažeistos akys (požymių kompleksas, pavadintas talidomido, arba Videmano, sindromu).

7.26 pav. **Paveldima (A) ir sukelta talidomido (B) fokomelija (ruoniagalūnystė)** (iš H. Ursprung, 1965)

Negalima tvirtinti, kad firma, sukūrusi vaistus, elgėsi nerūpestingai – netyrė galimų šalutinių pasekmių. Tiesiog tai pavyzdys, kad **graužikų**, kuriems buvo išbandyta ši medžiaga, ir **žmogaus ksenobiotikų metabolizmas gali iš esmės skirtis**, ir tai gali būti žmogui lemtinga. Graužikai atsparūs šiai medžiagai. Ir žmonės yra polimorfiniai pagal atsparumą šiam junginiui. Ne visos moterys gimdė nenormalius vaikus.

Pagaliau reikia atsižvelgti ir į **skirtingą suaugusio** žmogaus ir **vaisiaus jautrumą**. Talidomidas suaugusiam žmogui nėra kenksmingas (arba silpnai kenksmingas). Vaisius jautrus. Prisiminkime, kad daug citochromų P-450 ir apskritai ksenobiotikų metabolizmą koduojančių genų veiklūs tik subrendusio organizmo ląstelėse.

Vaistų, kuriuos vartojant nėštumo metu gali sutrikti vaisiaus raida, sąrašas ilgas. Kai kurie jų taip pat yra trankvilizatoriai (kaip talidomidas). Tai diazepamas – padidina naujagimių su nesuaugusiomis lūpomis ir gomuriu dažnį; fenobarbitalis, apie kurį, kaip stiprų citochromų P-450 genų induktorių, jau rašyta (žr. p. 311). Morfozes sukelia kai kurie traukulius slopinantys vaistai (vartojami sergančiųjų epilepsija) – irgi padaugėja vaikų su nesuaugusiomis lūpomis ir gomuriu, širdies ydomis ir kitomis anomalijomis. Natrio valproatas padidina naujagimių su nugaros smegenų išvarža skaičių; kai kurie antikoaguliantai (varfarinas) – su nepakankamai išsivysčiusia nosimi ir regos nervais (hipoplazija). Alkilinančiosios medžiagos, kaip priešvėžiniai vaistai, ne tik sukelia DNR pažaidas, bet ir trikdo (jeigu vartojami nėštumo metu) vaisiaus raidą.

Veiksniai arba procesai (vyksmai), kurie sukelia vaisiaus raidos sutrikimus, vadinami **teratogenais** (gr. *teras, teratos* – apsigimėlis, pabaisa). Vienas iš teratogenų yra alkoholis (fiziškai silpni vaikai, protinis atsilikimas), benzinas, benzolis, fenoliai, formaldehidas, įvairūs

nuodai, švinas ir gyvsidabrio garai. Teratogeniškai veikia vitaminų stoka ir perteklius, steroidiniai hormonai. Teratogeniškas yra ne tik egzogeninių, bet ir vidinių steroidinių hormonų perteklius, hormonų apykaitos ligos. Paradoksalu, bet ir fenilketonurija (nors tai geno mutacija) vystosi dėl fenilalanino pertekliaus, kuris veikia kaip teratogenas. Taip vystosi daug paveldimų metabolizmo ligų. Gerai žinoma, kad infekcinių ligų sukėlėjai – raudonukės, pūslelinės virusai (citomegalovirusas) yra teratogeniški.

Teratogenezė iš dalies yra nėščios motinos problema (nelaimė ar netinkamas gyvenimo būdas).

Manoma, kad nėščiai moteriai **iki trijų mėnesių nėštumo** nereikėtų vartoti cheminių medžiagų, ksenobiotikų ir stengtis kuo mažiau kontaktuoti su cheminėmis medžiagomis, saugotis infekcinių ligų. Svarbu ne tik teratogeno dozė, bet ir kontakto su teratogenu trukmė, vaisiaus raidos etapas.

Morfozė ar mutacija? Yra esminė riba tarp mutacijų ir morfozių:

- generatyvinės mutacijos paveldimos,
- morfozės nepaveldimos.

Organizmų, su kuriais galima eksperimentuoti, raidos pokyčius galima patikrinti, ar jie paveldimi. Antai minėta, kad pupų lapų margumas (žr. 7.1 pav.), kurį beveik šimtaprocentiniu dažniu sukelia jonizuojančioji spinduliuotė, alkilinančiosios medžiagos, kompleksonai, senėjimas, yra nepaveldimas. Jis dingsta viršutiniuose to paties augalo lapuose, kurių užuomazgos neturėjo tiesioginio kontakto su teratogenu.

Bet kaip patikrinti, ar Siamo dvyniai morfozė ar mutacija? Lietuvos kino studijos filme „Mutamina" net talidomido sukelti raidos pokyčiai pateikti kaip mutacijos. Mutacijomis baidomi skaitytojai ar klausytojai, kai kur nors atsivedamas gyvulys su dviem galvomis ar penkiomis kojomis ir pan...

Morfozės genotoksiškai pavojingesnės. Jos dažnesnės, net labai dažnos, palyginti su mutacijomis. Jų dažnis gali siekti 100%. Kai padaugėja naujagimių su vystymosi sutrikimais, pirmiausia reikia ieškoti teratogenų.

Mutacija ar fenokopija? Transdeterminacijos reiškiniai, kai drozofilos palikuonims vietoj antenos išauga koja (imituojama mutacija *Antennapedia*) arba vietoj vieno torakso ir vienos sparnų poros atsiranda dvi (imituojama mutacija *bithorax*), yra fenokopijų pavyzdžiai. Kaip minėta, transdeterminacijos dažnesnės už atitinkamo fenotipo mutacijas.

Fenokopijos – tai morfozės, kurios fenotipiškai imituoja kurią nors žinomą mutaciją. Mutacijų ir jas imituojančių fenokopijų fenotipinė kanalizacija (pastangų nukreipimas) sutampa.

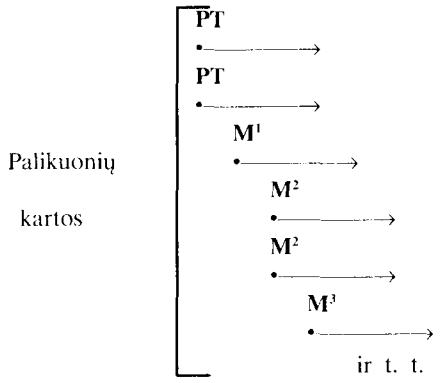
Tai gal kiek ir filosofiška, bet geriausiai paaiškina šį mutacijų ir morfozių (fenokopijų) fentotipinį sutapimą. Bus tas pats fenotipinis rezultatas, ar geno veikla pakis dėl mutacijos, ar dėl teratogeno poveikio. Svarbu, kad šie geno veiklos pokyčiai būtų vienodi, vyktų viena kryptimi. Todėl neatsakinga nuspręsti, ar tai mutacija, ar morfozė vien pagal fenotipo pokyčius, neatlikus specialių tyrimų. Svarstyklės turėtų krypti į morfozių pusę dėl didesnio šių dažnio. Fenotipiškai liga ar sindromas yra tas pats – ar jis būtų paveldimas, ar fenokopija (7.26 pav.). Morfozės gali iškreipti tyrimų rezultatus, kai vertinamas mutacijų dažnis. Į tai stengiamasi atsižvelgti.

Santykį tarp mutacijų ir jas imituojančių fenokopijų apsunkina tai, kad sunku nustatyti tą momentą, kai laikinas nepaveldimas fenokopijas pakeičia paveldimi genotipo pokyčiai – mutacijos. Tai atsitinka tada, kai daugelyje kartų veikia tas pats fenokopiją sukeliantis veiksnys ir kai atranka palankesnė stabiliems, paveldimiems pokyčiams – mutacijoms.

Genetinė modifikacijų asimiliacija. Taip pavadino anglų mokslininkas Vadingtonas (C. H. Waddington) reiškinį, kai **fenkopijas keičia mutacijos**. Keisdamas poveikio laiką eterio garais, jis drozofilai sukėlė įvairias fenokopijas: *crossveinless* (be skersinės gyslos), *bithorax* ir kt. Pakartojus poveikį garais ir atrinkus labiausiai sugebančius modifikuotis drozofilos individus, po 8–12 kartų paaiškėjo, kad *bithorax, crossveinless* yra paveldima. Genetinė modifikacijų asimiliacija nieko bendra neturi su lamarkiniu „įgytų požymių" paveldėjimu. Paaiškėjo, kad fenokopiją išstumia mutacijos, kurios yra tos pačios krypties kaip ir fenokopija. Tokios mutacijos gali atsirasti spontaniškai (gamtinės mutacijos), bet jas gali sukelti ir eterio garai.

Atsiradus tokio paties fenotipo mutacijai kaip ir modifikacija, **mutantų prisitaikymo (reakcijos normos) ribos pasislenka prisitaikymo prie aplinkos veiksnio kryptimi**. Taigi bet kurią tokio tipo mutaciją palaiko atranka, nes mutacija yra stabilus pokytis, nepriklauso nuo aplinkos svyravimų.

Jeigu kurioje nors geografinėje vietovėje nuolat didėja sausra (pvz., plečiantis dykumai), augalų prisitaikymą prie sausros galima pavaizduoti taip:



čia **PT** – pradinis tipas, **M¹**, **M²**, **M³** – naujos mutacijos, kurios sąlygoja didesnį atsparumą sausrai ir prisitaikymo ribos poslinkį atsparumo kryptimi. Prisitaikymo riba atsparumo kryptimi parodyta rodykle.

Tas pats aplinkos veiksnys tuo pačiu metu gali sukelti ir modifikaciją, ir mutaciją bei veikti kaip atrankos veiksnys, atliekantis atranką prisitaikymo prie aplinkos kryptimi.

Modifikacijos yra buferinė organizmo sistema besikeičiančioms aplinkos sąlygoms atsverti reakcijos normos ribose.

Tai greitas būdas reaguoti į pakitusias aplinkos sąlygas. Kai aplinkos veiksnys tampa nuolatiniu, modifikacijas keičia mutacijos.

Įgytų požymių problema istoriškai atsirado todėl, kad nemokėta atskirti (net nežinota, kad taip yra) to paties fenotipo paveldimų ir nepaveldimų pokyčių. Atleistina Lamarkui, kuris manė, kad „įgyti požymiai", t. y. modifikacijos, atsiradusios vykstant individualiai raidai, yra paveldimi. Antai laukinės antys daugiau skraido, todėl turi galingesnius sparnus, o naminės, atvirkščiai, daug vaikščioja, todėl jų

kojos stipresnės, stambesnės. Jis nesuprato, pvz., kad skirtumus tarp laukinių ir naminių ančių sąlygoja genotipas (genetiniai pradmenys). Jam pakako nustatyti, kad treniruojamas organas vystosi, o netreniruojamas sunyksta.

Šiuo metu griežtai turime laikytis tokios taisyklės: **modifikacija yra fenotipo, bet ne genotipo pokytis ir yra nepaveldima**. Ir jeigu yra kitaip, vadinasi,

- arba tai naujas genetinis reiškinys,
- arba tai išimtis iš taisyklės.

Išimtys iš dėsnių yra dažnas reiškinys genetikoje. Tačiau šiuo atveju jos turi būti **itin retos**, nes kitaip iš tikrųjų būtų griaunama visa paveldimumo esmė – **palikuonių kartų stabilumas.**

Genotrofai. Kad išimtys iš taisyklės itin retos, rodo ir paveldimi pokyčiai, kuriuos linams sukėlė trąšų stoka. 1954 m. anglų genetikas Diuranas (A. Durrant) atliko gana paprastą linų tręšimo bandymą. Vieni linai buvo tręšiami normaliai visomis reikalingomis trąšomis, kitiems trūko fosforo. Suprantama, šie užaugo mažesni. Tuo nieko nenustebinsi. Tačiau ir kitos kartos visus augalus auginant vienodomis ir normaliomis sąlygomis, augalai, prieš tai stokoję fosforo, buvo mažesni. Tokie liko iki šiol. Neįprasta buvo dar ir tai, kad pakito beveik visi išlikę augalai.

Kad tai neilgalaikė modifikacija, įrodyta genetiniais tyrimais. Branduolyje aptiktas lokusas, kuris lėmė šį paveldimą pokytį. Pokytis atsirado dėl pakitusios mitybos (gr. *trophe*), todėl pavadintas **genotrofu**. Vėliau kitų anglų mokslininkų, tęsiančių genotrofų tyrimus, buvo nustatyta, kad vienas genotrofų lokusas yra **amplifikuotas**, t. y. daug kartų padvigubėjęs.

Tiems, kurie norėjo patikrinti Darento bandymą, tai nepavyko padaryti. Be to, yra ilgametė augalų tręšimo patirtis, iš kurios aišku, kad taip nebūna. Tačiau mažaūgiai linai (tris kartus mažesni pagal bendrą augalų masę) – neginčijamas faktas.

Šiuo metu būtų galima siūlyti tokią šio reiškinio atsiradimo versiją:

- kaip atsakas į nepalankų aplinkos veiksnį (fosforo stoką) įvyko lokuso, sąlygojančio prisitaikymą prie fosforo bado, amplifikacija (žr. p. 208);

- genomo pertvarka, kuri vyksta somatinėse ląstelėse, yra griežtai uždrausta generatyvinėse ląstelėse (kokiu būdu, kol kas nenustatyta);
- galima spėti, kad kaip itin retas nukrypimas įvyko ir lokuso amplifikacija generatyvinėse ląstelėse, kuri paveldima kaip genotrofas.

Augalams gali būti **dar viena priežastis**: negavusių fosforo linų galėjo nunykti augimo kūgelis, ir jis regeneravo iš somatinių ląstelių. Tai labiausiai įtikėtina versija, nes linai tais metais, kai negavo fosforo, atrodė „kuproti", nunykusiomis viršūnėmis.

„Pavlovo bandymas" irgi yra įdomus, bet prieštaringai vertinamas. Pavadinimas kilęs nuo rusų fiziologo I. Pavlovo, kuris keliaudamas po pasaulį skaitė pranešimus apie sąlyginių refleksų ugdymą jūrų kiaulytėms. Palikuonims „pamokų" sąlyginiam refleksui įsiminti reikėjo mažiau negu tėvams. Bandymai pakartoti šiuos tyrimus labai prieštaringi, bet tęsiasi iki šiol jau be Pavlovo pavardės. Įdomiausi iš jų atlikti su jūrų kirmėlėmis planarijomis. Šių kirmėlių ypatybė ta, kad jos gali regeneruoti iš vienos ląstelės. Sensacinga yra tai, kad regenerantų nereikėjo „mokyti"– jie jau turėjo sąlyginį refleksą. **Sąlyginiai (įgyti) ir nesąlyginiai (įgimti) refleksai**. „Pavlovo" bandymas yra ir dingstis atkreipti dėmesį į svarbią elgsenos genetikos problemą: sąlyginius ir nesąlyginius refleksus.

C. POŽYMIŲ PAVELDĖJIMAS IR REKOMBINACIJA

Nors prokariotų genomas yra paprastesnės sandaros, tačiau eukariotų požymių paveldėjimas ir rekombinacija mums prieinamesni, suprantamesni ir artimesni reiškiniai. Tai atitinka ir mokslo istoriją. Prisiminkime (I sk.), kad požymių paveldėjimo ir rekombinacijos tyrimai prasidėjo 1900 m., kai buvo pakartotinai atrasti Mendelio dėsniai, taikomi eukariotams.

Eukariotų požymių paveldėjimą lemia:

- diploidiškumas ir homologinių-nehomologinių chromosomų skaičius;
- homologinių ir nehomologinių chromosomų paskirstymo dukterinėms ląstelėms būdas;
- genų, lemiančių požymį, skaičius ir sąveikos pobūdis;
- genų vieta chromosomoje ir rekombinacija tarp chromosomų.

Prokariotų (bakterijų) požymių/genų paveldėjimas priklauso nuo:

- geno vietos chromosomoje;
- polimorfizmo ir rekombinacijos.

Esminis skirtumas yra tas, kad **prokariotų genetinė medžiaga neatribota nuo visos kitos ląstelės dalies.** Eukariotų genų veikla prasideda atribotoje nuo šios ląstelės dalies erdvėje – branduolyje, todėl paveldėjimo reiškiniuose svarbus vaidmuo tenka branduolio membranai, kai prireikia ląstelėms dalytis, branduolio apvalkalėlis išnyksta.

VIII. BAKTERIJŲ IR VIRUSŲ GENETIKA

8.1. Bakterijos

Bakterijų ir virusų genetikos reiškiniai gana išsamiai nagrinėti kituose skyriuose, todėl jie pateikiami glaustai.

Genomo sandara. Daugumos bakterijų 99% visų genų yra žiedinėje DNR – bakterijos chromosomoje. Be to, bakterijos dažnai turi mažas autonomines žiedines DNR – **plazmides**. Jos skirstomos pagal įvairias ypatybes į konjugacines, perduodamas iš ląstelės į ląstelę ir lemiančias bakterijų rekombinaciją per konjugacinį tiltelį; episomas, gebančias įsiterpti į chromosomą, būti dvejopoje – integruotoje ir autonominėje (laisvoje) padėtyje; lemiančias atsparumą nuodams (R) ar įvairias kitas bakterijų savybes.

Visi bakterijos chromosomoje esantys genai paveldimi kartu ir sudaro vieną sankibos grupę. Plazmidžių genai sudaro atskiras sankibos grupes.

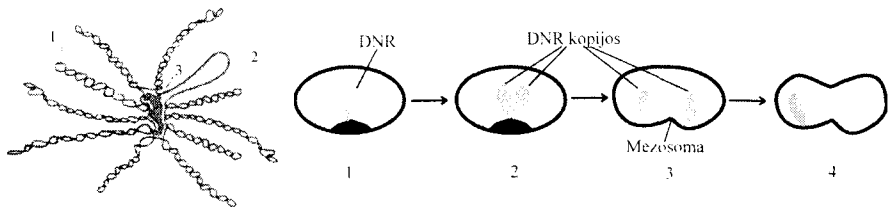
Bakterijų chromosoma. *Escherichia coli* chromosomoje yra apie 3000 genų. Maždaug ketvirtadalį jų sudaro genų sankaupos – operonai. Visi kiti genai išsibarstę po chromosomą, ir juos vienija į grupes valdymo būdas – reguloras. Tačiau genai bakterijų chromosomoje išsidėstę ne atsitiktinai, o pagal svarbą. Svarbiausias gyvybines funkcijas lemiantys genai (DNR replikacijos ir kt.) yra arčiausiai *ori C* – vietos, nuo kurios prasideda DNR replikacija.

Dauguma bakterijų genų – unikalūs, tik ribosominių RNR ir tRNR genai kartotiniai. *E. coli* rRNR genai pakartoti 7 kartus.

Kaip minėta, pagal bendrą genomo sandarą bakterijos skirstomos į:

- **eubakterijas** (gr. *eu* – tikras), tai *Escherichia coli, Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* ir kt.;
- **archebakterijas** (gr. *arche* – pradžia), kurių genomo sandara artimesnė eukariotams (genai turi intronus). Archebakterijos gyvena labai neįprastoje aplinkoje: halofilinės atsparios didelėms druskų koncentracijoms (didesnėms kaip 5,5 M NaCl), metanogeninės gamina metano dujas (CH_4), termoacidofilinės gyvena rūgščiose karštose versmėse (80°C).

Nukleoidas. Bakterijos ląstelė neturi vidinių kompartmentų. Kompaktiškai susipakavusi bakterijos chromosoma sudaro nukleoidą. Nukleoidas neturi branduolio apvalkalėlio, todėl transkripcija (mRNR sintezė) ir transliacija (baltymo sintezė) **erdviškai neatskirtos**, vyksta vienu metu. Baltymų kiekis gali padvigubėti per 20 min. Bakterijos turi ribosomas, kurios nesiskiria nuo eukariotų ribosomų. Nukleoide DNR neigiamai superspiralizuota ir išsidėsčiusi kilpomis – **domenais**,



A B

8.1 pav. **Bakterijų nukleoidas (*A*) ir DNR kopijų tikslios dalybos dukterinėms ląstelėms (*B*):**
A: *1* – superspiralizuoti domenai; *2* – relaksuotas domenas; *3* – baltyminė šerdis; *B*: *1* – DNR prisitvirtinusi prie įlinkusios į vidų ląstelės membranos – mezosomos; *2* – DNR replikacija ir kopijų padėtis; *3* – DNR prisitvirtinimo vietoje tarp dviejų DNR kopijų membrana ištįsta, atstumdama vieną kopiją nuo kitos; *4* – prasidėjęs citoplazmos pasidalijimas. Kiekvienai dukterinė ląstelė gauna po vieną DNR molekulę, prisitvirtinusią prie membranos

sudaro kompleksus su baltymais, bet nukleosominės sandaros yra tik užuomazgos (8.1 pav., *A*).

DNR replikacija vyksta šalia ląstelės membranos vidinės dalies. Specialiomis nukleotidų sekomis chromosomos ir plazmidžių DNR prisitvirtina prie membranos. Membranoje irgi yra **specialios DNR prisitvirtinimo vietos**. Šių skaičius lemia daugiakopijinių plazmidžių kopijų skaičių. Prisitvirtinimo vietoje ląstelės membranai tįstant, DNR kopijos atsistumia viena nuo kitos (8.1 pav., *B*). Šiame membranos tarpe tarp dviejų DNR kopijų ir persismaugia ląstelė, pasidalydama į dvi dukterines ląsteles. Taip DNR kopijos taisyklingai paskirstomos dukterinėms ląstelėms. Ląstelės dalijasi persismaugdamos.

Kai kurios bakterijos sudaro sporas. Sporos paprastai susidaro nepalankiomis sąlygomis. Jos kur kas atsparesnės nepalankiems aplinkos veiksniams ir gali būti įvairiais būdais perneštos tolyn nuo pirminės gyvenimo vietos, užimant naujas erdves.

Bakterijų rekombinacija. Pirmieji bakterijų rekombinaciją įtikinamai genetiniu metodu įrodė 1946 m. Lederbergas ir Teitumas, panaudoję du *E. coli* K12 kamienus, kurių kiekvienas nesintetino trijų medžiagų, konkrečiai pirmasis – cisteino (*Cys*$^-$), fenilalanino (*Phe*$^-$) ir biotino (*Bio*$^-$), antrasis – tiamino (*Thi*$^-$), treonino (*Thr*$^-$) ir leucino (*Leu*$^-$). Tokie kamienai, kurie nesintetina vieno ir daugiau metabolitų, vadinami **auksotrofiniais** (gr. *auxo* – augu, *trophe* – maistas, mityba). Juos auginant, nesintetinamų metabolitų reikia įdėti į terpę, antraip jie neauga.

Abu kamienai buvo auginami kartu minimalioje terpėje, kurioje nebuvo jokių priedų. Tai terpė, kurioje auga tik normalūs, prototrofiniai (gr. *protos* – pirmas) kamienai. Nepaisant to, *E. coli* augo. Ištyrus minimalioje terpėje augančių bakterijų savybes, paaiškėjo, kad jos gali sintetinti visas 6 medžiagas, t. y. ***Cys⁺Phe⁺Bio⁺Thi⁺Thr⁺Leu⁺***, ir ši savybė paveldima.

Kodėl pasirinkti tokie kamienai, kurie nesintetino trijų, o ne vienos ar dviejų medžiagų? Kaip tik dėl šio pasirinkimo Lederbergo ir Teitumo bandymas yra įtikinantis. Buvusių auksotrofų gebėjimas augti minimalioje terpėje gali būti ir dėl grįžtamosios mutacijos. Tačiau mutacijos tikimybė iš karto trijuose genuose ($10^{-7} \cdot 10^{-7} \cdot 10^{-7} = 10^{-21}$) yra neįtikėtina, todėl teko pripažinti, kad tarp kamienų buvo apsikeista genetine medžiaga. Vėliau buvo įrodyta, kad toks keitimasis galimas tik tiesiogiai kontaktuojant bakterijų ląstelėms, tarp jų susidarius **konjugaciniam tilteliui** (žr. 3.47 pav.).

Bakterijų konjugacija yra ypatinga: genetinės medžiagos perėjimas iš vienos ląstelės į kitą vyksta tik viena kryptimi.

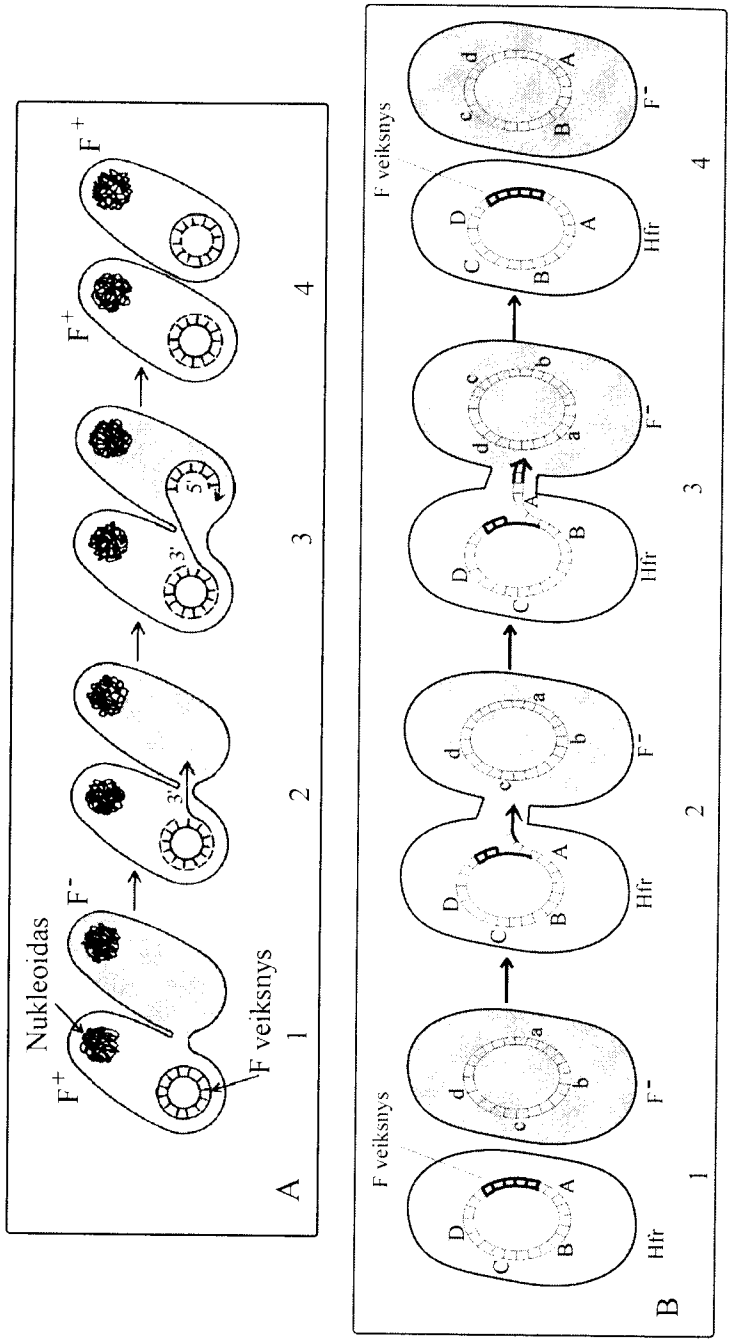
Bakterijų rekombinacija esant F plazmidei. Bakterijose nėra vyriškosios ir moteriškosios lyties, bet galima išskirti tris lytinius tipus: **F⁺, F⁻** ir **Hfr** (angl. *high frequency of recombination* – dažna rekombinacija). Juos lemia F plazmidė. Ji gali būti laisva arba įsiterpusi į bakterijos chromosomą. Bakterijos, kurios turi laisvą F plazmidę, vadinamos F⁺, o jos neturinčios – F⁻. Įsiterpusi į chromosomą F plazmidė lemia lytinį tipą Hfr.

Rekombinacija iš F⁺ į F⁻ reta. Bakterijų, kurios turi F veiksnį, užauga ilga išauga – pilė. Ja užkabinamos F⁻ ląstelės. Tada susidaro konjugacinis tiltelis, kuriuo pereina F⁺ veiksnys. Tiksliau, pereina tik viena plazmidės DNR grandinė. To pakanka, kad F veiksnys įsikurtų, ir tada

F⁻ virsta F⁺ (8.2 pav., *A*).

F⁺ ir F⁻ lytiniams tipams ilgiau būnant kartu, visos ląstelės virsta F⁺. Tačiau bakterijos chromosoma konjugaciniu tilteliu pereina labai sunkiai, todėl rekombinacija iš F⁺ į F⁻ yra reta.

Rekombinacija iš Hfr į F⁻ labai dažna. Kas dešimta F⁻ ląstelė gali būti rekombinantė. Rekombinacija padažnėja tūkstančius kartų.



8.2 pav. **Bakterijų rekombinacija:**
A: *1* – konjugacija; *2*, *3* – iš F⁺ į F⁻ pereina tik F veiksnys; *4* – F⁻ virsta F⁺; *B*: *1* – Hfr kamiene F veiksnys įsiterpęs į bakterijos chromosomą; *2* – F veiksnio vidinėje dalyje chromosoma trūksta, ir iš Hfr į F⁻ pereina tik dalis F veiksnio; *3* – pereina ir dalis bakterijos chromosomos; *4* – bakterijos po rekombinacijos: išlieka Hfr ir F⁻ lytiniai tipai, bet F⁻ įgijusi dalį genų iš Hfr (*A*, *B*); abiem atvejais pereina tik viena DNR grandinė

Tai atsitinka todėl, kad, įsiterpus F plazmidei į chromosomą, ši trūksta, bet taip, kad dalis F plazmidės yra viename gale, o kita – kitame gale (8.2 pav., *B*).

Plazmidžių, kurios pereina iš vienos ląstelės į kitą, pernaša prasideda nuo specialios nukleotidų sekos *oriT* (angl. *origin of transfer* – pernašos pradžia). Taigi Hfr kamienuose pirmasis pereina tas chromosomos galas, kuriame yra F veiksnio ***oriT***. Po to – genas, esantis arčiausiai *oriT*, toliau kitas, trečias... Taip galima nustatyti genų seką chromosomoje. Bakterijoms leidžiama konjuguoti įvairų laiką. Krestelėjus konjugacija nutrūksta. Pagal trukmę, reikalingą pereiti genui konjugaciniu tilteliu, matuojamas atstumas tarp gretimų genų. Jis nustatomas laiko vienetais.

Paprastai visa bakterijos chromosoma konjugaciniu tilteliu nespėja pereiti, nes tiltelis nutrūksta. Visai *E. coli* chromosomai pereiti reikėtų apie 90 min. Tik praėjus visai bakterijos chromosomai, abu F plazmidės galai vėl gali susijungti, ir tik tada F^- virsta Hfr. Įvairiuose Hfr kamienuose F plazmidė būna įsiterpusi į skirtingas vietas bakterijos chromosomoje.

Kai yra Hfr kamienas, lengvai pernešami chromosomos genai, bet F^- paprastai nevirsta Hfr arba F^+.

Kadangi iš bakterijos-donoro į bakteriją-recipientą (iš F^+ į F^- arba iš Hfr į F^-) pereina ne visa chromosoma, susidaro dalinė heterozigota – **merozigota**. Ji būna laikinai, kol pasibaigia rekombinacija ir susidaro rekombinantai (ląstelės-organizmai, kuriuose įvykusi rekombinacija).

Kiti DNR pernašos ir rekombinacijos būdai. Transformacija. Prisiminkime, kad transformacijos reiškinį dar 1928 m. aptiko anglų bakteriologas Grifitas. Jis atrado, kad, paveikus užmuštais S formos pneumokokais gyvus R formos pneumokokus, šie virsta (transformuojasi) S:

$$S_{negyvi} + R_{gyvi} \xrightarrow{\textit{R formos transformacija}} S_{gyvi,}$$

tačiau tik 1944 m. amerikietis Eiveris ir jo bendradarbiai išaiškino, kad pneumokokų R transformaciją į S atlieka DNR. Ją reikia išskirti iš S formos pneumokokų ir paveikti R formos pneumokokus (recipientą). Organizmas, iš kurio DNR išskiriama ir naudojama transformacijai, vadinamas **donoru**, o kuris yra paveikiamas (gauna) DNR – **recipientu**.

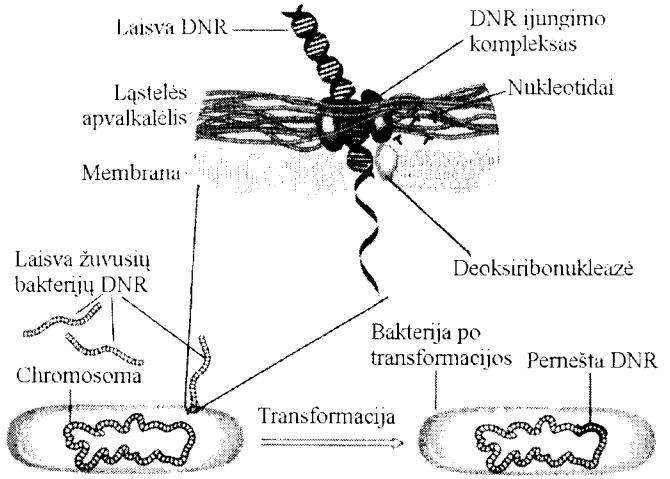
Kad transformacija vyktų sėkmingai, būtina išskirti nesuirusią DNR, kurios molekulinė masė būtų ne mažesnė kaip $1 \cdot 10^8$ Da. Be to, donoro DNR nors iš dalies turi būti homologinė recipiento DNR, todėl transformaciją pavyksta gauti tik rūšies viduje arba tarp artimų rūšių. Nehomologinė egzogeninė DNR veikia kaip mutagenas.

Recipientas auginamas specialiomis sąlygomis, kad ląstelės taptų **kompetentinės**, t. y. imlios egzogeninei DNR. Imlumas trunka gana trumpai – 30–60 sekundžių.

Transformacija yra pagrindinis bakterijų gamtinės rekombinacijos būdas.

Iš pradžių manyta, kad tai dirbtinis, grynai žmogaus sukurtas rekombinacijos tipas.

Egzogeninė DNR bakterijų populiacijose atsiranda suirus žuvusioms bakterijų ląstelėms (8.3 pav.). Bakterijos yra pasirengusios priimti egzogeninę DNR. Pastaroji pro membraną įsiskverbia **pinocitozės** būdu (citoplazminėje membranoje atsiranda įdubimas, į kurį patenka DNR;

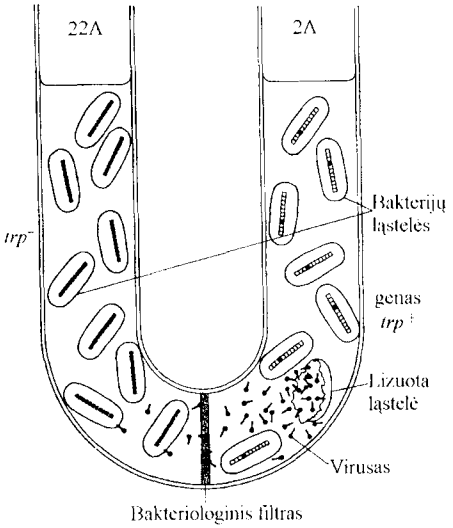


8.3 pav. **Gamtinė bakterijos transformacija:**
DNR šaltinis aplinkoje – žuvusios bakterijų ląstelės (remiantis R. V. Miller, 1998)

membrana ją apgaubia, susidaro pinocitozinė pūslelė, ir ši patenka į ląstelės vidų). Membranoje yra specialių receptorių, prie kurių tvirtinasi DNR. Egzogeninei DNR įsiskverbti į ląstelę padeda transformacijos veiksniai, t. y. nedideli polipeptidai, saviti įvairioms bakterijų rūšims.

Transformaciją gerokai mažina deoksiribonuklezės. Pavyzdžiui, iki 1970 m. nepavyko sukelti transformacijos *E. coli*, kuri turi labai aktyvias deoksiribonukleazes. Panaudojus mutantus, kuriuose šie fermentai sintetinami silpnai, transformacija aptikta ir *E. coli*. Maždaug kas trečia ląstelė, į kurią įsiskverbia egzogeninė DNR, yra transformantė.

Transdukcija yra bakterijų rekombinacija, kai virusai perneša bakterijos DNR. Ją 1952 m. įrodė Zinderis (N. D. Zinder) ir Lederbergas. Mintis, kad virusas perneša vieno šeimininko genus kitam, atrodė neįtikėtina. Tai teko įrodyti specialiu būdu. Paimtas **U** raidės vamzdelis su apatinėje dalyje įlydytu bakteriologiniu filtru (8.4 pav.), praleidžiančiu virusus, bet nepraleidžiančiu bakterijų. Vamzdelis pripildytas minimalios mitybinės terpės (be priedų). Joje auga normalios bakterijos, gebančios sintetinti visas normaliai sintetinamas medžiagas. Vamzdelyje buvo auginami du bakterijų *Salmonella typhimurium* kamienai: dešinėje gebantis sintetinti triptofaną (***trp***$^+$), kairėje negalintis jo sintetinti (***trp***$^-$). Bakteriologinis filtras neleido susimaišyti dviem bakterijų kamienams. Minimalioje terpėje auga tik *trp*$^+$ kamienas. Šis kamienas buvo užkrėstas bakteriofagu P22.



8.4 pav. **Bandymo, įrodančio *Salmonella typhimurium* transdukciją, schema:**
2A – kamienas, sintetinantis triptofaną (*trp*$^+$); 22A – nesintetinantis triptofano (*trp*$^-$)

Virusams bakteriologinis filtras nebuvo kliūtis. Lizavę *trp*$^+$ kamieno ląsteles, jie pro bakteriologinį filtrą pateko į kairiąją vamzdelio pusę. Ten irgi pradėjo augti bakterijos, bet jos buvo *trp*$^+$, vadinasi, gebančios pačios sintetinti triptofaną. Bakterijos, neužkrėstos virusais, kairėje vamzdelio pusėje neaugo. Vadinasi, šie virusai pernešė *trp*$^+$ geną iš vieno kamieno į kitą – įvyko transdukcija.

Transdukcijos dažnis yra 10^{-5}–10^{-7}, tačiau gaunami ir lizatai, kurie sukelia dažną transdukciją. Jie vadinami **Hft** (angl. *high frequency of transduction* – dažna transdukcija). Dažną transdukciją sukelia defektyvūs virusai. Mat viruso galvutėje dalis (arba net ir visa) fago DNR turi būti pakeista šeimininko-donoro DNR, todėl, virusui pernešus DNR į šeimininko-recipiento ląstelę, šios kitos viruso funkcijos nepasireiškia. Jis nesidaugina ir neardo bakterijos ląstelės, ši neįgyja imuniteto kitiems virusams, t. y. netampa lizogenine ir kt. (žr. toliau). Perkelti pavyksta ne daugiau kaip 1–3% bakterijos chromosomos, todėl perkeliami tik 1–2 genai, ir transdukcija, kaip ir transformacija, tiriama genų sankiba.

Transdukcijos tipą lemia:

- viruso įsiterpimo į bakterijos-donorės chromosomą pobūdis;
- pernešto bakterijos-donorės DNR segmento sąveika su bakterijos-recipientės chromosoma.

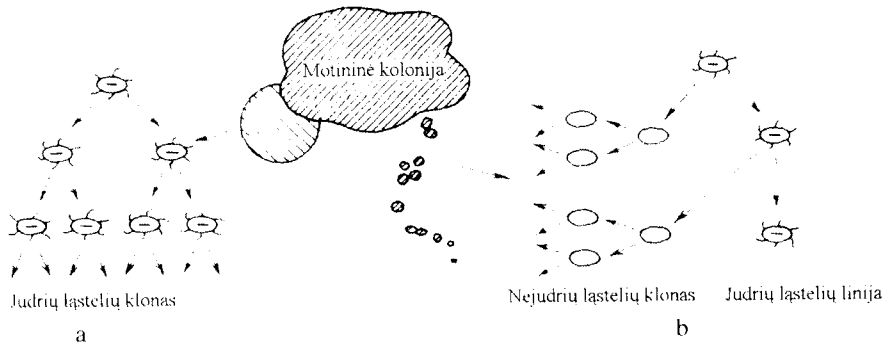
Virusai, kurie bakterijos chromosomoje turi daug įsiterpimo vietų, atlieka **nespecifinę (bendrąją) transdukciją**. Tas pats virusas gali pernešti įvairius bakterijos genus.

Nuosaikieji virusai (žr. toliau), kurie turi tik vieną įsiterpimo vietą, atlieka **specifinę (ribotąją) transdukciją**. Perkeliami tik tie genai, kurie yra šalia viruso įsiterpimo į bakterijos chromosomą vietos *att* (angl. *attachment* – pritvirtinimas). Pavyzdžiui, virusai λ arba φ 80 prisitvirtina šalia *gal*$^+$ (galaktozės) geno, todėl jie perneša šį geną. Tačiau ir ribotą transdukciją atliekantys virusai, nors retai, gali pernešti ir kitus genus, nes be specifinio *att*, bakterijos genome gali būti antrinių integracijos sekų (antrinės *att*).

Kad būtų **stabilioji (visiška) transdukcija** (8.5 pav., *a*), šeimininko-donoro DNR segmentas turi įsiterpti į recipiento chromosomą. Kartais bakterijos chromosomoje atsiranda du tokie patys DNR lokusai, būtent *gal*$^+$ ir *gal*$^-$. Virusas įsiterpia į recipiento chromosomą, o pernešamas bakterijos-donorės chromosomos segmentas lieka kaboti šalia recipiento chromosomos. Taip susidaro **heterogenota** (vieno geno „heterozigota“).

Donoro chromosomos segmentas gali ir neįsiterpti į recipiento chromosomą. Tokios DNR replikacija nevyksta, ir ji dažniausiai suyra. Tačiau kartais ji išlieka. Be to, veikli, t. y. lemianti požymį.

35. 1313



8.5 pav. **Stabili (*a*) ir abortyvi (*b*) transdukcija** (pagal R. Sager, F. Rayan, 1961)

Kadangi šio fragmento replikacija nevyksta, tai jį paveldi tik viena iš dviejų dukterinių ląstelių. Vadinasi, viena dukterinė ląstelė įgyja požymį, o kita – ne. Tokio tipo transdukcija vadinama **abortyviąja** (lot. *abortyvus* – neišsivystęs). Ją ypač patogu stebėti pagal geną, nulemiantį žiuželių vystymąsi, kai jis perkeliamas į bakterijų ląstelę, kuri yra be žiuželių (8.5 pav., *b*).

Seksdukcija – bakterijos chromosomos segmento pernaša iš donoro recipientui episomų tipo plazmidėmis. Tai labai panašu į transdukciją, tik vienur virusai, kitur plazmidės. F^+ virtimas Hfr yra grįžtamasis reiškinys. Išeidama iš chromosomos, F plazmidė gali išsinešti dalį bakterijos chromosomos, ir, būdama autonominėje būklėje, lengvai jį pernešti į F^- ląsteles. Tokia plazmidė žymima F′.

Pernešto DNR segmento įsiterpimas į recipiento genomą – svarbus rekombinacijos etapas, būdingas visiems bakterijų rekombinacijos tipams. Jis nulemia rekombinacijos sėkmę. Nuosaikieji virusai ir plazmidės turi priemonių įsiterpti į recipiento chromosomą. Dėl šios savybės nuosaikieji virusai ir plazmidės genų inžinerijoje yra vektoriai.

Plazmidžių pernešto DNR segmento likimas gali būti dvejopas:

- **gali įsiterpti į bakterijos-recipientės chromosomą**, jeigu plazmidė įsiterpusi į recipiento chromosomą;
- **perneštas segmentas gali neįsijungti į recipiento chromosomą**, jeigu jį pernešusi plazmidė lieka laisva. Genų inžinerijai naudinga, kad toks genas būtų daugiakopijinėje plazmidėje. Kiekviena plazmidės kopija yra ir pernešto geno kopija.

F plazmidės įsiterpimas į bakterijos chromosomą, genetinės medžiagos perėjimas ir pagaliau pernešto chromosomos fragmento įsijungimas į recipiento chromosomą yra sudėtingi reiškiniai, reguliuojami ne tik F plazmidės, bet ir bakterijos chromosomos genų. Bakterijos chromosomoje, pvz., yra genai ***recF, recB, recC*** ir kt., kurie nulemia įsiterpimui reikalingų endonukleazių ir egzonukleazių sintezę. Būtini RecA, SSB ir kiti baltymai. Recipiento chromosomoje yra χ-sekos (chi), kurias pažįsta **Rec BCD** baltymas:

5′–GCTGGTGG–3′
3′–CGACCACC–5′

Šios sekos *E. coli* chromosomoje yra maždaug kas 5–10 kb. Jos asimetrinės. To pakanka, kad Rec BCD egzonukleazė sužinotų, kuria kryptimi jai skaidyti DNR grandinę. Rec BCD nukleazė skaido DNR grandinę tik tada, kai ji tvirtinasi prie DNR iš reikalingos pusės.

8.2. Virusai

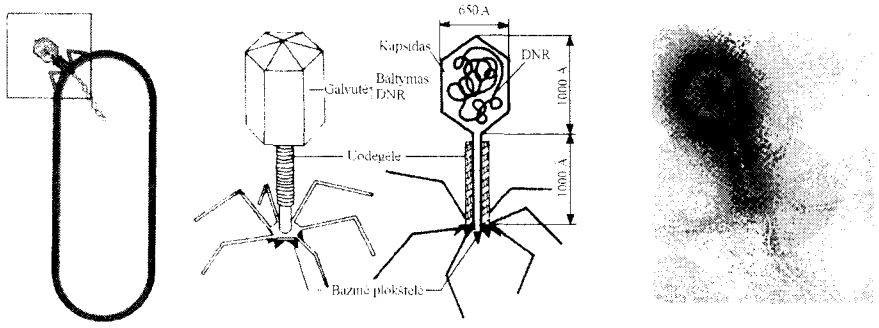
Virusai nėra prokariotai. Tai neląstelinė gyvybės forma, nors be ląstelės virusai negali gyventi. Visos gyvybinės virusų funkcijos vyksta šeimininko ląstelėje. Virusų už ląstelės ribų funkcija – užkrėsti naujas ląsteles ir iškęsti nepalankias sąlygas, kurių nepakelia ląstelė-šeimininkė.

Virusų genetikos pradžia siejama su 1941 m. atrastais bakterijų virusais – bakteriofagais. Tačiau kertinis virusų genetikos vystymosi atradimas buvo tai, kaip virusas patenka į ląstelę.

Viruso įsiskverbimas į ląstelę. Transfekcija. 1952 m. Heršis ir Čeiz išaiškino, kad į ląstelę įsiskverbia ne visas virusas, o tik jo vidinė dalis (8.6 pav., *A*), t. y. DNR arba RNR. Nepaisant to, ląstelėje reprodukuojasi virusai su tomis savybėmis, kokios buvo viruso, užkrėtusio ląstelę.

Kad DNR ir RNR yra atitinkamų virusų genetinė medžiaga, patvirtino ir Frenkelio-Konrato (H. Fraenkel-Conrat) darbai. Jam pavyko virusų infekciją sukelti grynais tabako mozaikos viruso RNR preparatais. Iš virusinės RNR atsigamino būdingos struktūros virusai. Panašūs eksperimentai daryti ir su virusine DNR.

Viruso atsistatymas iš jo nukleorūgšties sudaro apie 1% lygio, kuris būdingas, kai ląstelę užkrečia nepažeistas virusas. Tačiau padidinus DNR arba RNR skvarbumą, galima labai padidinti ir atsistatymą. Pavyzdžiui, paveikus *Escherichia coli* ląstelių apvalkalėlius juos ardančiu fermentu lizocimu, į ląsteles įsiskverbia 20–30% fago φX174 DNR.



A B C

8.6 pav. **Bakteriofago patekimas į bakterijos ląstelę (*A*) ir sandara (*B, C*)**

Bakteriofagai turi specialių priemonių prisitvirtinti prie bakterijos ląstelės ir „įšvirkšti" į vidų savo vidinę dalį. *Escherichia coli* T virusų sandara pavaizduota 8.6 paveiksle, *B* ir *C*.

Įsiskverbimas į ląstelę vyksta endocitozės būdu. Virusas tvirtinasi prie membranoje esančio **receptoriaus**, kurio paskirtis ląstelėje kitokia – makromolekulių patekimas į ląstelę. Virusas pasinaudoja šia savybe ir visa makromolekulių patekimo sistema. Apsigaubia **pūslele (vezikule)** ir su ja patenka vidun. Vezikulės viduje intensyviai suyra viruso kapsidas, ir viruso genomas su viruso šerdyje esančiais baltymais pakliūva į citoplazmą ar į branduolį. Tai priklauso nuo viruso.

Bendra sandara. Nepaisant virusų įvairovės, bendra jų sandara yra tapati. Išorėje esti baltyminis apvalkalas **kapsidas**. Vidinėje dalyje yra viruso nukleorūgštis ir šiek tiek (1–3% viso kiekio) baltymų, kurie daugumai virusų reikalingi vos tik įsiskverbus į ląstelę.

Nuo tipiškos virusų sandaros skiriasi viroidai ir virusoidai (satelitiniai/palydoviniai virusai).

Viroidai yra labai nedidelės infekcinės RNR, neapdengtos baltyminiu apvalkalu (kapsidu).

Virusoidų sandara panaši į viroidų, bet turi tipišką viruso kapsidą. Jie negali savarankiškai reguliuoti genetinės medžiagos replikacijos, jiems reikia viruso pagalbos, todėl jie dar vadinami **palydoviniais virusais.** Pasitaiko ir fagų-satelitų. Toks pvz., yra P4. Subrendusios jų dalelės atsiranda tik bakterijų ląstelėse, užkrėstose (lizogeninėse) viruso P2.

Virusų grupės pagal genetinę medžiagą. Pagal tai, kokia yra nukleorūgštis, virusai skirstomi taip:

- ***DNR virusai;*** jie gali būti:
- **dvigrandžiai** (dauguma bakteriofagų, adenovirusai, kai kurie pūslelinės virusai – citomegalovirusas, Epšteino-Baro virusas);
- **vienagrandžiai** (*E. coli* fagas ϕX174, žinduolių – parvovirusas);

- ***RNR virusai*** (dauguma augalų virusų, apie pusė žinduolių virusų); jie gali būti:
  - **vienagrandžiai**, jie skirstomi pagal **replikaciją ir transkripciją**:
    1) **plius grandinės** – jų replikacija ir transkripcija-transliacija vyksta tiesiogiai (encefalito, geltonojo drugio, raudonukės, poliomielito virusai);
    2) **minus grandinės** – tiesiogiai replikacija ir transkripcija-transliacija nevyksta, pirma turi būti sintetinama plius grandinė (gripo, vezikulinio stomatito, pasiutligės virusai);
  - **dvigrandžiai** (reovirusai);

- ***retrovirusai*** – nusako ir gyvavimo būdą; jie gali būti dvejopos būsenos:
  - **laisvi;** jų genetinė medžiaga yra RNR,
  - **įsiterpę į šeimininko chromosomą,** genetinė jų medžiaga yra DNR.

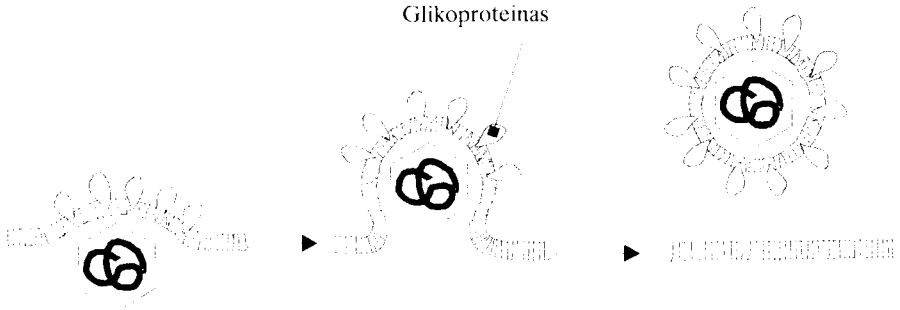
Laisvoje būsenoje RNR yra **linijinė**, galuose turi trumputes kartotines sekas. RNR atlieka dvejopą vaidmenį:

- nuo jos atvirkštinė transkriptazė sintetina DNR, kuri po to įterpiama į ląstelės-šeimininko genomą;
- nuo DNR vyksta retroviruso mRNR transkripcija, o ant šios mRNR – transliacija, t. y. viruso baltymų sintezė. Tokią retroviruso mRNR galima pažinti pagal tai, kad, kaip įprasta mRNR, prie jos 5′ galo prijungiama kepurė, o prie 3′ galo – poli A. Bet įsidėmėtina, kad mRNR sintetinama nuo DNR matricos, ir tai atlieka ląstelės baltymai – RNR II polimerazė. Šiai grupei priklauso įgyto imunodeficito virusai HIV-1,2, onkovirusai (žmogaus – HTLV-1,2).

Retrovirusai ir kiti virusai, kurie apsupti lipidų membranos, išsilaisvina **pumpuravimo** būdu. Šie virusai koduoja glikoproteiną, kuris įstatomas į ląstelės membraną. Naujai susidarę virusai palieka ląstelę ypatingu būdu – **egzocitozės**. Jie ląstelės nesunaikina.

Išimtis – **HIV virusai**, kurie sunaikina vieno tipo T limfocitus – T_h ląsteles (helperius).

Prie membranos tvirtinasi viruso šerdis arba visas virusas (su kapsidu). Virusas apsigaubia membrana, ir nuo ląstelės paviršiaus atsiskiria „pumpuras"– virusas, apsuptas lipidinio apvalkalo:



Prisitvirtinimas prie membranos Apsigaubimas membrana Viruso („pumpuro") išsilaisvinimas

Ląstelė nesuardoma, o iš jos pastoviai ir dideliais kiekiais išsilaisvina virusai.

Virusų grupės pagal gyvavimo būdą irgi susijusios su genetine medžiaga – jos reprodukcija. Be retrovirusų, dar yra nuosaikieji ir virulentiniai virusai.

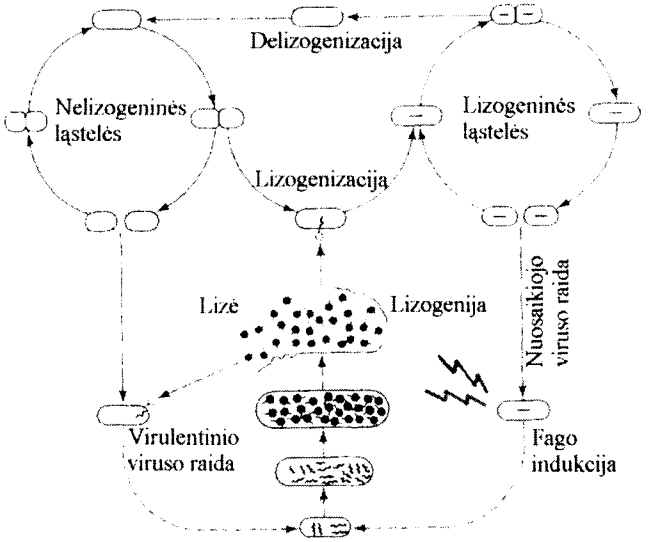
Nuosaikieji (lizogeniniai) virusai – dar viena virusų grupė, kuri „taikiai" sugyvena su ląstele-šeimininke. Jie irgi būna dvejopos būsenos: laisvi ir įsiterpę į ląstelės genomą, bet jų genetinė medžiaga pastoviai yra DNR. Laisvi jie būna retai. Būtinos ypatingos sąlygos, kad šie virusai iš integruotos pereitų į autonominę būseną (prisiminkime fago indukciją).

Paprastai jie dauginasi kartu su ląstele-šeimininke – jos chromosoma, kurioje tūno virusas. Šioje padėtyje virusas vadinamas **profagu**, o ląstelė, kurioje yra profagas, – **lizogenine**. Bakterijų lizogeninių virusų esmę išaiškino Lvovas (A. Lwoff). Ląstelės, kuriose nuosaikusis virusas įsiterpęs į chromosomą, yra įgijusios imunitetą kitiems homologiniams

virusams. Taigi profagas yra savotiška viruso ir ląstelės simbiozė, dėl kurios virusas reprodukuojasi kartu su ląstele (8.7 pav.).

Laisvi nuosaikieji virusai elgiasi kaip ir virulentiniai – pasidaugina ir suardo ląstelę. Lizavę ląstelę, virusai užkrečia tik naujas ląsteles. Viruso išsiskyrimas iš lizogeninių bakterijų buvo pavadintas **lizogenija** (lot. *lysis* – irimas, ištirpimas, *geneia* – atsiradimas, kilmė), o bakterijų užsikrėtimas nuosaikiaisiais virusais – **lizogenizacija**. Tarp lizogeninių ląstelių palikuonių gali atsirasti ir nelizogeninių ląstelių. Vadinasi, profagas gali būti prarastas. Toks reiškinys vadinamas **delizogenizacija**. Lizogeninės bakterijos žymimos nurodant skliaustuose virusą. Pavyzdžiui, *Escherichia coli* kamienas K12, užkrėstas nuosaikiojo viruso λ, užrašomas taip: *E. coli* K12 (λ).

Nuosaikiųjų virusų aptikta ne tik bakterijose, bet ir kituose organizmuose. Į kai kuriuos obelų poskiepius įskiepijus įvairių obelų veislių, išauga žemaūgiai augalai. Kartais šią savybę irgi sąlygoja nuosaikieji virusai. Tada organizmas, kurio ląstelėse įsiterpę nuosaikieji virusai, gali įgyti naujų savybių. Šis reiškinys pavadintas **lizogenine konversija**. Ryškiausias to pavyzdys difterijos bakterijos *Corynebacterium diphteriae*. Žmonės arba gyvūnai suserga difterija tik tada, kai jos ląstelės gamina toksiną. Nelizogeninės bakterijos toksino negamina.



8.7 pav. **Viruso raida:**
kairėje – virulentinio, dešinėje – nuosaikiojo viruso raida (remiantis A. Lwoff, 1953)

Be toksinų sintezės, nuosaikieji virusai gali lemti bakterijų ląstelių formą, paviršinius serotipus ir kt.

Virulentiniai virusai (lot. *virulentus* – nuodingas), užkrėtę ląsteles, jas pajungia pirmiausia savosios genetinės medžiagos reprodukcijai, kuri vyksta labai spėriai (8.7 pav.). Po to ląstelės transliacijos sistema panaudojama viruso (kapsido) baltymų sintezei. Kitu etapu iš sudedamųjų viruso dalių susistato virusai. Tokie virusai vadinami **virionais**. Pagaliau suardoma ląstelė, ir šimtai virusų užkrečia naujas ląsteles, kad vėl viskas kartotųsi iš naujo. Kaip kokia grandininė reakcija. Virulentinių virusų gyvavimo būdas pasmerkia juos pačius: labai spėriai viskas „suryjama", suardoma. Tai, matyt, ir buvo dingstis atsirasti virusams, kurių gyvavimas yra nuosaikesnių formų.

Virusų genomo ypatybės. Virusų genomo talpa svyruoja labai didelėse ribose: beždžionės viruso SV40 žiedinėje DNR yra 5243 bp, o Epšteino-Baro, pūslelinės virusų DNR – iki 200 kb.

Nepaisant šių skirtumų, virusai labai talpūs ir taupūs genetinės informacijos atžvilgiu. Taupoma keliais būdais:

- dažni sanklotiniai genai (genas gene, arba vieną geną iš dalies uždengia kitas genas);
- labai dažnas alternatyvus splaisingas (iš to paties transkripto subręsta kelios mRNR);
- vienas bendras polipeptidas suskaidomas į keletą baltymų;
- genome yra tik patys būtiniausi genai, kiek įmanoma naudojamasi ląstelės-šeimininkės genų produktais: poliA, kepure, tRNR, ribosomomis, rRNR ir baltymais.

Virusai turi genus, kurių koduojami baltymai pajungia šeimininko ląstelę savo naudai, slopina ląstelės baltymų sintezę ir imuninę sistemą. Šiuo atžvilgiu virusai itin „išradingi" ir individualūs: gali koduoti baltymus, imituojančius antikūnus ir kitus ląstelės paviršinius baltymus, polisacharidus, pašalinti geležį iš gyvūnų baltymų ir kt.

Bendra genomo sandara priklauso nuo organizmo, kuriame virusai gyvuoja.

Virusų rekombinacija. Nors virusams lytinis dauginimasis nebūdingas, tačiau vieną šeimininko ląstelę užkrėtus keliais virusais dvi DNR molekulės gali apsikeisti segmentais. Tai analogiška krosingoveriui. Todėl ir virusų DNR anksčiau buvo kartografuojama pagal rekombinacijos dažnį tarp trijų genų. Užkrėtus dviem virusais ląstelę,

taip pat galima tirti virusų genų sąveiką, įvairius komplementacijos tipus, atlikti viruso genomo analizę.

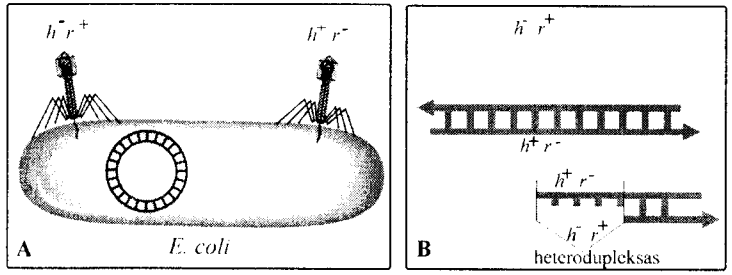
Virusų rekombinaciją išaiškino 1946 m. Heršis ir Delbriukas. Būtina jos sąlyga – virusai turi būti giminingi. Užkrėtus ląstelę dviem negiminingais virusais, vienos rūšies virusas išstumia kitos rūšies virusą (8.8 pav.).

Virusų rekombinacijos ypatybės tokios:

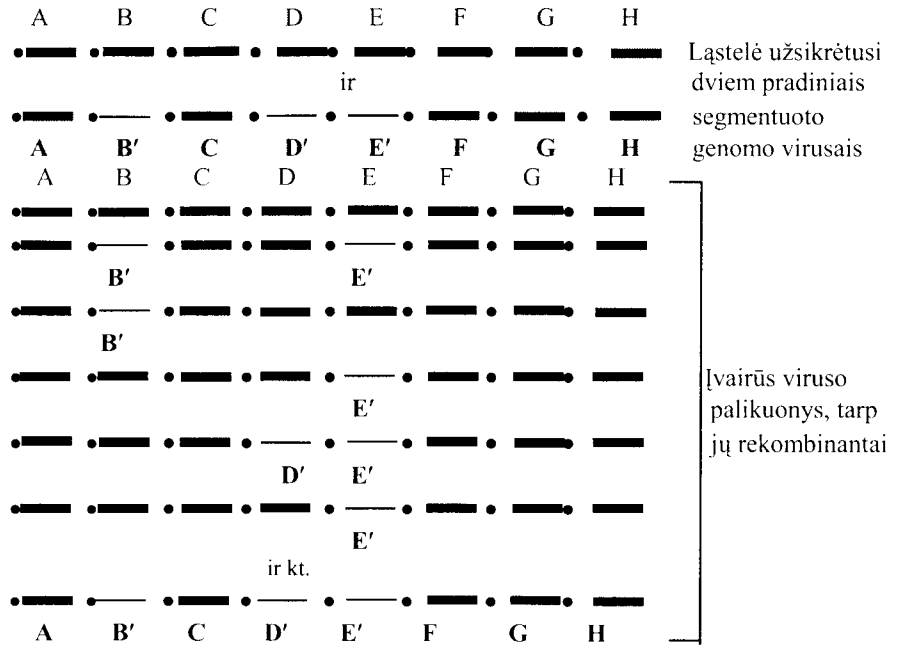
- **poliškumas.** Jeigu viename viruse yra genai *AB*, o kitame *ab*, tai rekombinantų *Ab* ir *aB* turėtų susidaryti vienodai, tuo tarpu vieno tipo rekombinantų gaunama daugiau;
- **heterogenotų susidarymas**. **Heterogenota** – diploidinė (ir heterozigotinė) būklė ne tarp visų, o tik tarp pavienių genų. Ji susidaro genomo dalyje, ne didesnėje kaip 1%. Kadangi viruso genome yra tik viena DNR molekulė, viruso heterozigotiškumas pasireiškia todėl, kad, auginant du virusus kartu, tarp dviejų DNR molekulių gali susidaryti heterodupleksas (8.8 pav.). Šioje vietoje viena DNR molekulės grandinė yra iš vieno viruso, antra – iš antro. Tai laikina.

Saviti virusų rekombinacijos būdai. Genomo segmentacija. Virusai turi ir labai savitų rekombinacijos būdų. Vienas jų – genomo segmentacija. Keletas virusų, kurių genetinė medžiaga yra RNR, turi segmentuotą genomą. Kiekvienas toks segmentas koduoja vieną arba daugiau baltymų. Antai gripo viruso genomas yra iš 8 segmentų. Kiekvienas jų koduoja 1–2 baltymus.

Užsikrėtus iš karto dviejų ir daugiau genetinių tipų virusais, keičiamasi segmentais tarp jų, ir susidaro nauji virusų serotipai.



8.8 pav. **Virusų rekombinacija:**
A – *E. coli* užkrečiama skirtingų genotipų h^-r^+ ir h^+r^- virusais; *B* – heterodupleksas h^+r^-/h^-r^+



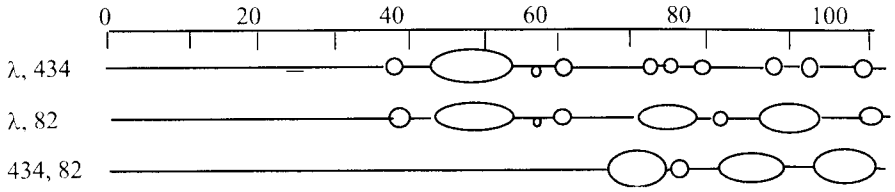
Kuo daugiau genome segmentų, tuo didesnis viruso serotipų polimorfizmas. Čia, matyt, ir yra paslaptis, kodėl gripo virusas toks „kosmopolitas“ ir aplanko mus kiekvienais metais ir ne po vieną kartą. Imuninei sistemai sunkiau prisitaikyti prie dažnai besikeičiančių viruso serotipų.

Moduliai. Šis rekombinacijos tipas aptiktas bakteriofaguose. Ypač smulkiai ištirtas nuosaikusis λ virusas.

> **Moduliai** yra nukleotidų sekos, kurios genome yra toje pačioje vietoje, turi tą pačią paskirtį, bet nėra homologai ir net gali būti įvairaus dydžio, bet gali pakeisti viena kitą.

Jie perduodami iš vieno viruso kitam nepakeisti, kaip sakoma, nuo A iki Z. Be to, į genomą įsistato visas modulis. Vieną modulį su kitu ir su visa kita viruso dalimi jungia **jungtukas**. Jis yra ir ta riba, kuri riboja modulį nuo visos kitos genomo dalies. Šios modulio dalys – jungtukai yra homologiniai. Iš esmės tai judrieji virusų genomo elementai. Tipiški judrieji genomo elementai kaip tik ir keičia vietą, sąveikaudami su įsiterpimo vieta (taikiniu) trumputėmis homologinėmis sekomis.

Keičiantis moduliais, susikuria virusų įvairovė (polimorfizmas):



Čia pavaizduotas keitimasis moduliais („išsipūtimai“ – heteroduplleksai, hibridinės vietos tarp dviejų virusų) tarp trijų giminingų liamboidinių virusų: λ, 434 ir 82.

Moduliais gali būti nukleotidų sekos (net lipnūs galai, reguliacinės geno dalys), pavieniai genai, genų grupės su skirtingais valdymo elementais.

IX. EUKARIOTŲ POŽYMIŲ PAVELDĖJIMAS IR REKOMBINACIJA

9.1. DNR kopijų paskirstymas. Mitozės tipai

Po DNR replikacijos, padvigubinančios vienodai tiek prokariotų, tiek eukariotų genus, centriniu įvykiu tampa taisyklingas DNR kopijų paskirstymas dukterinėms ląstelėms. Bet pats DNR kopijų paskirstymas ir ląstelės dalijimasis gali būti nesusieti:

- DNR replikacija vyksta, bet kopijos lieka tame pačiame branduolyje ar net chromosomoje (endomitozė, politenija);
- susidaro dukteriniai branduoliai, bet ląstelės nesidalija (daugiabranduolių ląstelių atsiradimas);
- ląstelė dalijasi, o DNR sintezė nevyksta (mejozės antrajame dalijimesi).

Išskirtinė eukariotų ypatybė – dukterinėms ląstelėms paskirstoma ne viena, kaip prokariotų, o **keletas ar net keletas dešimčių, o kartais šimtų chromosomų**. Dėl šios priežasties eukariotų ląstelės dalijasi labai sudėtingai, dviem skirtingais būdais: mitozės ir mejozės. Mejozė yra pakitusi (modifikuota) mitozė.

Ląstelės dalijimasis prasideda nuo DNR sintezės. Bet prieš tai vyksta dideli paruošiamieji įvykiai, kaupiamos reikiamos medžiagos. Ir kol ląstelė nepasiruošusi, ji nesidalija (žr. p. 332). Prisiminkime, kad žmogaus somatinės ląstelės pagal gebėjimą dalytis skiriamos į tris grupes:

- **ląstelės, kurios nesidalija po to, kai audinio diferenciacija pasibaigusi** – raumenų, nervų;
- **ląstelės, kurios diferencijuotos normaliai nesidalija, bet gali (būti stimuliuojamos) dalytis** – kepenų;
- **ląstelės, kurios pastoviai ir greitai dalijasi** – odos, epitelio, spermatocitai, kaulų čiulpų.

Pastoviai ir greitai (ciklas gali trukti tik 8 val.) dalijasi ne pačios diferencijuotos ląstelės, o jų **kamieninės ląstelės**, iš kurių vystosi epitelio, odos, kraujo ląstelės. Visų jų dalijimasis yra valdomas. Pasigaminęs

ląstelių perteklius „numarinamas“. Vyksta programuota ląstelių žūtis – **apoptozė** (gr. *apo* – šalin + *ptosis* – kritimas).

Ląstelės ciklas ir valdymas smulkiau išnagrinėti IV skyriuje. Ląstelės ciklu vadinamas laikotarpis nuo vieno ląstelės dalijimosi iki kito. Ląstelės ciklas dalijamas į mitozę siaurąja prasme, arba mitozės fazę, arba tiesiog M fazę, ir interfazę. M fazė dalijama į 5 smulkesnes fazes: profazę, prometafazę, metafazę, anafazę ir telofazę (9.1 pav.). Interfazė dalijama į 3 (ar 4) smulkesnes stadijas G_0/G_1, S ir G_2.

Mitozės tipai labai svarbūs požymių paveldėjimui. Tipiškai mitozei būdinga tai, kad dukterinės ląstelės gauna visko po lygiai. Svarbu net kaip padalijama citoplazma. Skiriami du jos padalijimo tipai:

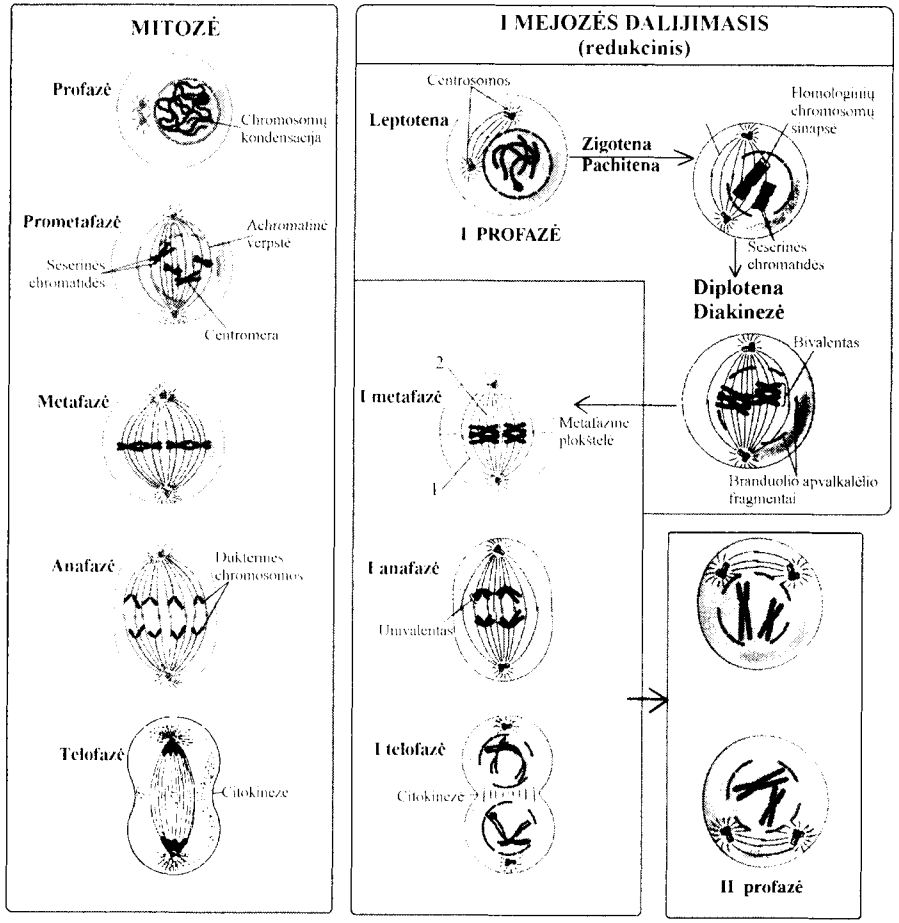
- **simetrinė mitozė**, kai abi dukterinės ląstelės gauna maždaug po lygiai citoplazmos;
- **asimetrinė mitozė**, kai citoplazma padalijama netolygiai. Vienai dukterinei ląstelei jos tenka daug.

Asimetrinė mitozė vyksta labai reikšmingais organizmo raidos momentais. Pvz., kiaušinėlio pirmojo dalijimosi metu, ir tai iš karto nulemia, kokios bus ląstelės: generatyvinės ar somatinės. Taip yra nematodo *Caenorhabditis elegans*, kai kurių varliagyvių ir kt. Gaubtasėklių augalų asimetriškai dalijasi mikrosporos ląstelė į generatyvinę ir vegetatyvinę. Nevienodai paskirstoma citoplazma ir jų gemaliniame maišelyje: susidaro 6 smulkios ir viena stambi centrinė ląstelė, iš kurios vystosi endospermas. Keturių po mejozės susidariusių ląstelių trys smulkiosios sunyksta, lieka viena stambi – pirminis gemalinis maišelis (9.2 pav.).

Žinduolių gametogenezėje citoplazma irgi paskirstoma netolygiai: didžioji dalis tenka kiaušialąstei. Smulkučiai poliniai kūneliai sunyksta (9.3 pav.).

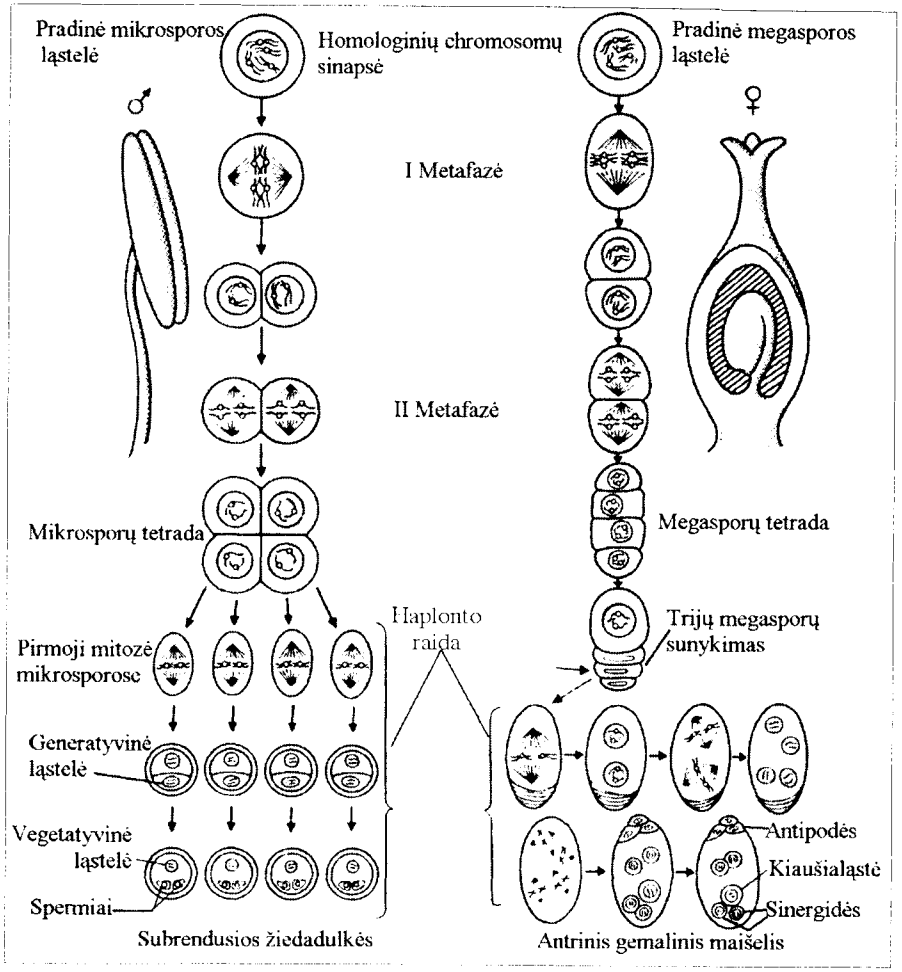
Mitozė be citokinezės – branduolys dalijasi, bet nevyksta citokinezė, todėl susidaro daugiabranduolės ląstelės. Vėlgi tai gali vykti svarbiais organizmo raidos momentais: augalų antrinio gemalinio maišelio susidarymo tarpiniais etapais, drozofilos blastodermoje ir kt. Kai kurių grybų daugiabranduolės yra vegetatyvinės ląstelės.

Sincitis – savita mitozės forma, kai daugiabranduolėje ląstelėje vienu metu apie kiekvieną branduolį vyksta citokinezė. Kaip tik tai atsitinka gaubtasėklių augalų gemaliniame maišelyje ir drozofilos blastodermoje, todėl pastaroji vadinama sincitine.



9.1 pav. **Mitozės ir I mejozės (redukcinio) dalijimosi palyginimas:** mejozės I profazėje chromosomos ne tik kondensuojasi, bet ir vyksta homologinių chromosomų sinapsė, susidaro homologinių chromosomų poros bivalentai; mitozės metafazėje ekvacinėje plokštumoje išsidėsto padvigubėjusios chromosomos, o mejozės I metafazėje – bivalentai (homologinių chromosomų poros); mitozės anafazėje – telofazėje į polius keliauja dukterinės chromosomos, o mejozės I anafazėje – telofazėje – univalentai (padvigubėjusios homologinės chromosomos); I telofazėje – II profazėje chromosomos išlieka kondensuotos, padvigubėjusios – iš 2-jų chromatidžių, o mitozės telofazėje chromosomos dekondensuojasi

Endomitozė – pamatas poliploidinėms ląstelėms atsirasti. Ji normaliai vyksta kai kuriose somatinėse ląstelėse. Chromosomos padvigubėja, bet nesidalija branduolys.

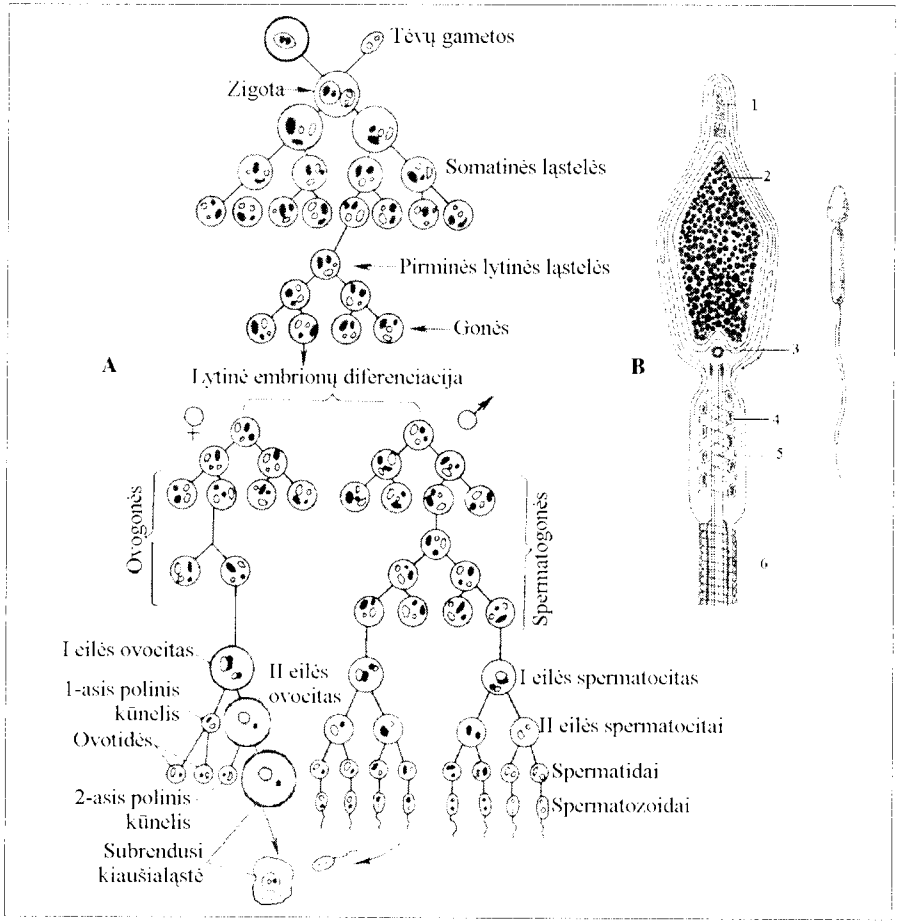


9.2 pav. **Gaubtasėklių augalų sporogenezė ir gametogenezė**

Politenija irgi būdinga kai kurioms somatinėms ląstelėms. Chromonema dalijasi daug kartų (vyksta DNR replikacija), bet neišsiskiria – susidaro **politeninės chromosomos**.

Endoreprodukcija – padvigubėja tik pavienės chromosomos arba jų dalys (pvz., esant amplifikacijai). Normaliai tai vyksta somatinėse ląstelėse.

Amitozė – tiesioginis branduolio pasidalijimas nesusidarant achromatinei verpstei. Aukštesniesiems eukariotams nebūdinga, pasitaiko kaip anomalija su aneuploidinėmis dukterinėmis ląstelėmis.



9.3 pav. **Žinduolių gametogenezė (A) ir spermatozoido sandara (B):**
B: *1* – akrosoma iš Goldžio komplekso, ja praardoma skaidrioji zona ir kiaušialąstės apvalkalėlis; *2* – branduolys; *3* – centriolė; *4* – chondriomas, iš mitochondrijų sudarytas energijos centras; *5* – kaklelio ašis; *6* – uodegėlė

Žemesniųjų eukariotų (pirmuonių) gali būti įprastas dauginimosi būdas, bet ir šiuo atveju genetinė medžiaga paskirstoma taisyklingai, nes branduolys segmentuotas ir kiekvienas segmentas – visas chromosomų rinkinys – genomas. Dukteriniams branduoliams tenka daugiau ar mažiau segmentų su visu chromosomų rinkiniu (po to dukterinėse ląstelėse šių segmentų skaičius didėja iki valdomos normos). Infuzorijų makrobranduoliuose minichromosomų tiek daug ir jos tokios smulkios, kad kiekvienos chromosomos kopijų tenka

dukteriniams makrobranduoliams, nesvarbu, kaip dalytųsi vegetatyvinėse ląstelėse makrobranduoliai.

Chromosomų judėjimas. Centromera ir kinetochoras lemia tikslų chromosomų pasiskirstymą ir net tai, ar apskritai jis vyks.

Pirmiausia chromosomos prometafazėje aktyviai juda vidurio plokštumos link. Šis tarpsnis menkai ištirtas, bet nustatyta, kad neapsieinama be judėjimo baltymų – kinezinų (Nod) ir kitų. Be to, chromosoma, bent pradžioje, kol formuojasi achromatinė verpstė, yra labai aktyvi, sukaliojasi, kol prie kinetochoro prisijungia kinetochoro mikrovamzdeliai (9.4 pav.). Susiformavus achromatinės verpstės poliams su mikrovamzdeliais ir prie kiekvienos chromosomos prisitvirtinus kinetochoro vamzdeliams, prasideda patys įdomiausi įvykiai. Chromosoma ir poliniai mikrovamzdeliai gaudo vienas kitą. Chromosoma sukinėjasi apie ašį, juda pirmyn ir atgal polių link. Poliniai mikrovamzdeliai rangosi lyg gyvatės, kol pagaliau kinetochoro ir poliniai mikrovamzdeliai užkabina vienas kitą. „Pagautos“ chromosomos antras kinetochoras susijungia su priešingo poliaus poliniu mikrovamzdeliu. Kai visos chromosomos pagaliau pagaunamos, prasideda metafazė.

Metafazėje chromosomų vaidmuo atrodo pasyvus, bet kol nepasidalija centromera, tol dukterinės chromosomos sukabintos viena su kita.

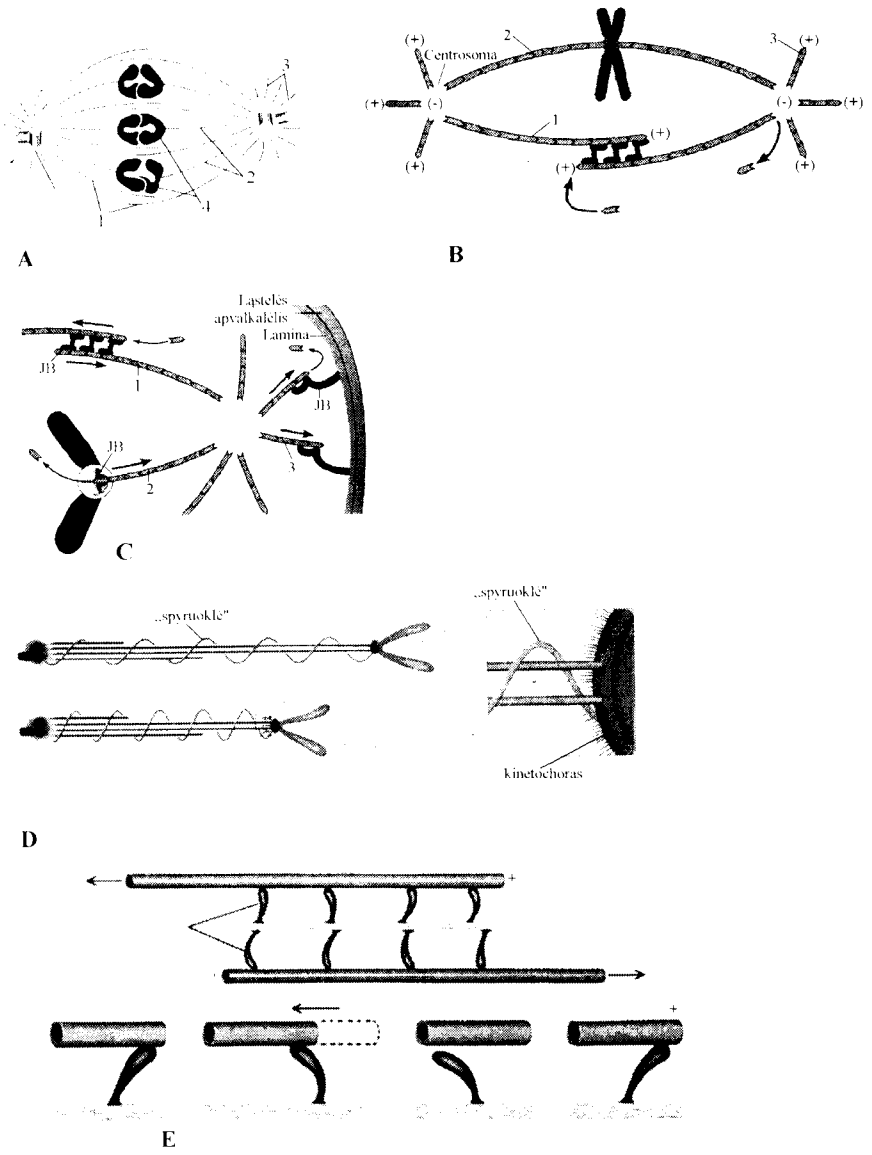
Achromatinės verpstės reikšmė ypatinga. Ji ir yra ta ląstelės struktūra, kurios paskirtis mitozėje taisyklingai paskirstyti dukterines chromosomas. Pirmojo mejozės dalijimosi metu achromatinė verpstė taisyklingai paskirsto homologines chromosomas. Ji sudaryta iš daugybės mikrovamzdelių, kurie susistato iš tubulinų, suirus citoskeletui.

Mikrovamzdelių sandaroje, be tubulinų, 10–15% tenka kitiems baltymams. Jie vadinami **MAP** (angl. microtubule – associated protein).

Prie mikrovamzdelių įvairiais būdais jungiasi judėjimo (motoriniai) baltymai: kinezinai, aktinai, dineinai. Šie baltymai sudaro **plaušelius (mikrofilamentus)**, kurie labai svarbūs įvairiems chromosomų judėjimams – pirmiausia polių link (žr. toliau). Mikrovamzdeliai yra trijų tipų (9.4 pav., *A* ir *B*):

- **poliniai,** tęsiasi nuo vieno poliaus kito poliaus kryptimi, peržengdami vidurio plokštumą, kurioje išsidėsčiusios chromosomos; jie prie chromosomų nesitvirtina;
- **kinetochoro**, kurie tvirtinasi prie kinetochoro;
- **žvaigždiniai (astriniai)** – trumpi mikrovamzdeliai, nukreipti ląstelės membranos link ir su ja sąveikaujantys.

36. 1313



9.4 pav. **Dukterinių chromosomų judėjimo polių link mechanizmai:** *A, B, C* – mikrovamzdelių tipai: *1* – poliniai; jais kaip bėgiais (*B, D*) dukterinės chromosomos stumiamos priešingomis kryptimis; *2* – kinetochoro; *3* – žvaigždiniai; *4* – dukterinė chromosoma; *B* – tubulinų subvienetų prisijungimo (+) ir irimo (–) vietos ir kryptys; *C* – judėjimo baltymų (JB) prisijungimo vietos; *D* – „spyruoklė"; *E* – judėjimas bėgiais; apačioje pavaizduotas judėjimo baltymo „svaidyklės" judesys

Mikrovamzdelių ir visos verpstės paskirtis – chromosomų padėtis metafazėje ir judėjimas besidalijančios ląstelės polių link anafazėje. Ypatingą reikšmę turi centromera ir kinetochoras. Jų sandara ir paskirtis jau nagrinėta. Būtent su kinetochoro baltymais sąveikauja kinetochoro mikrovamzdeliai. Čia yra ir judėjimo baltymų (kinezinų, aktino). Kinetochorais chromosoma ir nukreipiama polių link. Tai labai svarbu, nes būtent ši orientacija lemia dukterinių chromosomų (chromatidžių) judėjimo kryptį.

Šiuo metu labai intensyviai tiriamas chromosomų judėjimas polių link anafazėje. **Anafazė** prasideda po to, kai išilgai pusiau pasidalija centromera, išnyksta ryšys tarp chromatidžių, ir šios jau kaip savarankiškos dukterinės chromosomos juda polių link. Tai jau susiformavusios chromosomos. Jos yra tipiškos chromosomai nukleosominės sandaros. Kada ir kaip tai atsitinka, susidomėta tik pastaruoju metu (žr. toliau).

Chromosomų vaidmuo ir šiame tarpsnyje nėra pasyvus, ypač pradžioje. Tai labai ryšku filmuose, kuriuose nufilmuotos gyvos besidalijančios ląstelės. Jose aiškiai matyti, kaip chromosomos labai smarkiai atsispiria viena nuo kitos. Taigi viena iš chromosomų judėjimo versijų yra tokia. Prie kinetochorų prisitvirtinę judėjimo (motoriniai) baltymai (9.4 pav., *C*) labai stipriai atstumia vieną dukterinę chromosomą nuo kitos. Manoma, kad iš šių baltymų susidaro spyruoklės pavidalo struktūra, kuri prieš centromeros pasidalijimą yra suspausta (9.4 pav., *D*). Kai tik centromera pasidalija, nebelieka to „kabliuko", kuris laiko „spyruoklę" suspaustą. Ši atsileidžia ir švysteli dukterinę chromosomą poliaus link.

Motorinių baltymų plaušeliai (mikrofilamentai) aptikti ir kinetochoro bei polinių vamzdelių kontakto vietose (9.4 pav., *B* ir *C*). Manoma, kad jie suteikia chromosomai kryptį judėti poliaus link. Judesys atsiranda tokiu būdu: plaušelis atsilenkia ir stipriai švysteli chromosomą pirmyn (9.4 pav., *E*). Prie mikrovamzdelių galų irgi jungiasi judėjimo baltymai, daugiausia kinezinų šeimos. Drozofilos ląstelėse juos koduojančių genų *nul* mutantuose sutrikusi achromatinės verpstės sandara, apie 90% kiaušinėlių negyvybingi, tarp kitų 30–50% sudaro aneuploidai. Vadinasi, sutrikęs taisyklingas chromosomų paskirstymas.

Metafazėje dalis polinių mikrovamzdelių yra laisvi nuo chromosomų. Jie vienas kitą šiek tiek dengia ties vidurio plokštuma, kurioje

išsidėsto chromosomos. Prasidėjus anafazei, šie laisvi poliniai mikrovamzdeliai ilgėja, atstumdami vieną polių nuo kito. Kiek netikėta tai, kad chromosomų judėjimą polių link gali lemti ir **žvaigždiniai (astraliniai) mikrovamzdeliai.** Anksčiau manyta, kad jų paskirtis tik atraminė. Kaip Titanui laikyti visą achromatinės verpstės pusę. Tačiau nustatyta, kad prie žvaigždinių vamzdelių vienu galu jungiasi judėjimo baltymai (9.4 pav., *C*). Kitu galu jie tvirtinasi prie ląstelės membranos vidinės dalies. Tai ta atsvara, į kurią tempiamas visas dukterinių chromosomų kompleksas (iš polinių – kinetochoro vamzdelių ir dukterinių chromosomų).

Pamatuotai manoma, kad visi šie chromosomų judėjimo būdai veikia kartu.

Toliau vyksta citokinezė: citoplazma dalijasi į dvi dalis dviem būdais, susidaro skersinė pertvarėlė arba persismaugia.

Chromosomų judėjimas mejozėje sudėtingesnis. Visa tai, kas aukščiau išdėstyta, galioja ir mejozei. Mejozės I profazės zigotenos-pachitenos stadijose homologinės chromosomos yra konjugavusios, paskui centrine dalimi atsistumia viena nuo kitos, laikosi tik telomeriniais galais.

Chromosomoms judėti reikia daug energijos. Apskaičiuota, kad vienai chromatidei nustumti poliaus link sueikvojama 20 ATP molekulių. O kur dar kiti chromosomos judesiai!

9.1.2. Mejozė. Homologinių chromosomų konjugacija

Mejozė yra specialus dalijimosi būdas, kuris iš diploidinių ląstelių padaro haploidines ląsteles. Jos paskirtis tokia:

- išlieka pastovus chromosomų skaičius, susiliejus dviem lytinėms ląstelėms;
- tolygiai, dėsningai paskirstomos homologinės chromosomos;
- programuotai vyksta genetinė rekombinacija.

Ši būna dviejų tipų:

- homologinės chromosomos atsitiktinai derinasi su chromosomomis iš kitų chromosomų porų; galimų derinių skaičius lygus 2^n (pvz., drozofilos $2^4 = 16$; žmogaus $2^{23} = 8388608$);
- apsikeičiama segmentais tarp homologinių chromosomų – vyksta krosingoveris (homologinė rekombinacija).

Mejozė skiriasi nuo diploidinių ląstelių mitozės trimis esminiais reiškiniais:

- dviem ląstelių pasidalijimais ir tik viena DNR replikacija;
- homologinių chromosomų konjugacija ir pasiskirstymais;
- programuotu krosingoveriu.

Mejozės eiga. Mejozėje ląstelės dalijasi du kartus, tačiau chromosomos padvigubėja tik vieną kartą. DNR replikacija vyksta, ir chromonema padvigubėja iki prasidedant mejozės I profazei. Pirmą kartą dalijantis ląstelėms, būna tokios pačios fazės kaip ir mitozėje, tik labai užtrunka I profazė, kuri skirstoma į keletą stadijų (9.1 pav.):

- **leptoteną** (plonas siūlas) – chromosomos vis labiau kondensuojasi;
- **zigoteną** (susijungęs siūlas) – vyksta homologinių chromosomų sinapsė, kartu chromosomos dar daugiau kondensuojasi;
- **pachiteną** (storas siūlas) – susijungusios poromis chromosomos (bivalentai) toliau trumpėja ir storėja;
- **diploteną** (dvigubas siūlas) – sinaptinė homologinių chromosomų trauka staigiai dingsta, ir chromosomos atsitraukia viena nuo kitos visu ilgiu, išskyrus **chiazmus** (homologinių chromosomų sankryžas), labai ryškiai matyti, kad kiekviena chromosoma sudaryta iš dviejų chromatidžių;
- **diakinezę** (judėjimas į priešingus galus) – bivalentų kondensacija pasiekia maksimumą, homologinės chromosomos baigia atsitraukti viena nuo kitos. Kai kurių organizmų rūšių homologinės chromosomos sukibusios tik galais.

Leptotenos-zigotenos stadijose chromosomos vienu galu susigrupavusios ir prisitvirtinusios prie branduolio membranos (tankios plokštelės).

Kaip ir mitozės profazėje, mejozės I profazėje išnyksta branduolėlis ir branduolio apvalkalėlis. Po to prasideda I prometafazė: chromosomos (bivalentos) juda į vidurio plokštumą. I metafazė ypatinga tik tuo, kad achromatinės verpstės siūlai nuo vieno poliaus prisitvirtinę prie vieno univalento (t. y. homologinės chromosomos) centromeros, o nuo kito poliaus – prie kito univalento centromeros. Kaip tik todėl I anafazėje į priešingus polius juda po vieną univalentą, t. y. dukteriniams branduoliams tolygiai ir dėsningai pasiskirstomos homologinės chromosomos. Ir I anafazėje, ir I telofazėje univalentai negrįžta į pirminę sandarą, lieka kompaktiški, ir aiškiai matyti, kad kiekvienas univalentas sudarytas iš dviejų chromatidžių.

Tarp I ir II dalijimųsi nėra ryškios interfazės. Per trumpą pertrauką tarp I ir II dalijimųsi – interkinezėje – chromosomos nesikeičia. DNR replikacija tarp šių dalijimųsi nevyksta, todėl chromosomų po šių dviejų pasidalijimų sumažėja per pusę. Gaunamas haploidinis chromosomų skaičius, t. y. dukterinių ląstelių branduolyje yra po vieną chromosomą iš kiekvienos homologinių chromosomų poros. Susidaro 4 haploidinės ląstelės. Įvairių organizmų mejozė vyksta skirtingose raidos stadijose:

Pagal tai mejozė skirstoma į 3 tipus:

- **zigotinę**; ji vyksta zigotoje lytinėms ląstelėms susiliejus;
- **sporinę**; ji būdinga daugumai augalų: po mejozės susidaro haploidinės sporos, iš jų vystosi gametofitas, kuriame, be mejozės, vystosi lytinės ląstelės;
- **gametinę**; po jos susidaro lytinės ląstelės.

Gaubtasėklių augalų gametofitas labai redukuotas, sumažėjęs. Tuoj pat sporose susidaro lytinės ląstelės (9.2 pav.).

Gyvūnų būtina skirti generatyvinio kelio ir lytines ląsteles. Generatyvinio kelio ląstelės nepatiria tų visų pokyčių, kurie būdingi somatinėms ląstelėms (žr. III sk.). Sąlyginai jas galima vadinti nediferencijuotomis. Šios ląstelės laipsniškai vystosi, diferencijuojasi į lytines ląsteles. Žinduolių moteriškos ir vyriškos lytinės ląstelės vystosi skirtingai (9.3 pav.). **Moteriškos lytinės** ląstelės vystosi iš gemalinio kelio ląstelių, vadinamųjų ovogonių. Iš jų diferencijuojasi **I eilės ovocitai**. Juose vyksta redukcinis branduolio dalijimasis, bet pati ląstelė dar nesidalija. Daugelio žinduolių lytinės ląstelės baigia brėsti tik apsivaisinimo metu. Ovocitai įgyja gebėjimą būti apvaisinti. Tačiau jų branduolio dalijimasis

toliau blokuojamas: vienų I metafazėje, kitų II metafazėje. Prisiminkime, kad brendimo pabaigą skatina MPF (brendimą skatinantis veiksnys). Žmogaus ir kai kurių gyvūnų tolesnė ovogenezė sustoja, ir tai gali trukti metų metus. Pirmasis mejozės dalijimasis baigiasi tik ovuliacijos metu (žr. toliau). Kitų gyvūnų I eilės ovocitų lėto augimo fazę pakeičia greito augimo fazė. Čia įvyksta rDNR genų amplifikacija ir susidaro ekstrachromosominė rDNR. Didėja masė – labai padaugėja ribosomų ir trynio. Pasidalijus I eilės ovocitui, susidaro dvi ląstelės. Viena jų stambi – II eilės ovocitas, o kita smulki – polinis kūnelis. Abi ląstelės dalijasi dar kartą. Iš stambiosios ląstelės vėl gaunamos dvi dukterinės ląstelės. Stambioji ląstelė diferencijuojasi į **kiaušialąstę**, o kita – vėl smulkus polinis kūnelis. Po antrojo mejozės dalijimosi susidaro trys poliniai kūneliai. Jie sunyksta. Tik anomaliniais atvejais polinis kūnelis išlieka. Tada jis apvaisinamas, bet gemalas iš jo greit žūva.

Spermatozoidai (vyriškos lytinės ląstelės) irgi vystosi laipsniškai. Iš I eilės spermatocitų po mejozės susidaro keturios lygiavertės ląstelės:

I eilės spermatocitai (2n)
↓←Pirmasis – redukcinis dalijimasis
II eilės spermatocitai (n)
↓←II mejozės dalijimasis
spermatidės
↓←Diferenciacija
spermatozoidai

Tai labai stipriai pakitusios ląstelės (9.3 pav.). Spermatozoidai turi būti labai judrūs ir energingi, kad pasiektų kiaušialąstę ir sugebėtų į ją prasiskverbti: įveikti skaidriąją zoną (*zona pellucida*), pratirpdinti kiaušialąstės apvalkalėlį. Tai tikras spermatozoido vertės patikrinimas. Todėl svarbią spermatozoido dalį sudaro mitochondrijų kompleksas chondriomas, aprūpinantis spermatozoidą energija.

Žmogaus gametogenezės ypatumai. Žmogaus ir kitų žinduolių kiaušialąstės vystosi folikuluose (pūslelėse). Folikulas pilnas skysčio, viduje yra kiaušialąstė. Jo sienelei įplyšus, kiaušialąstė patenka į pilvo ertmę, o iš ten į kiaušintakius. Kiaušialąstės išėjimas iš folikulo (Grafo pūslelės) vadinamas **ovuliacija**.

Žmogaus kiaušialąstės dydis 150–200 µm, masė 0,001 mg. Ji 1000 kartų stambesnė už spermatozoidą. Jau penkių mėnesių moteriškos lyties vaisiuje yra I eilės ovocitai. Jų yra apie $6{,}8 \times 10^6$. Gimimo metu jų skaičius jau būna sumažėjęs iki 2×10^6, subrendusios moters – tik apie 200000 nebaigusių bręsti kiaušialąsčių. Iš jų vidutiniškai per visą gyvenimą baigia bręsti 300–600.

Vyro spermatozoidai gaminasi iš naujo. Spermatogenezė trunka apie 64 dienas (nuo I eilės spermatocito iki visiško subrendimo 6 savaites). Dėl šio skirtumo vyriškoms ir moteriškoms lytinėms ląstelėms nevienodai pavojingos ekstreminės aplinkos sąlygos, ypač paveldimus pokyčius sukeliantys mutagenai. Moteriškose lytinėse ląstelėse poveikiai sumuojasi. Manoma, kad ilgas laikotarpis tarp pirmojo mejozės dalijimosi ir ovuliacijos yra viena iš priežasčių, kodėl toms moterims, kurios gimdo būdamos vyresnės kaip 35 metų, dažnesni aneuploidai.

Homologinių chromosomų konjugacija. Chromosomos juda ekvatorinės plokštumos kryptimi ir į polius taip pat, kaip ir mitozėje. Tik vykstant mejozei chromosomos atlieka ir kitokius judesius, nebūdingus mitozei: homologinės chromosomos suartėja. Šis suartėjimas vadinamas **konjugacija**, arba **sinapse**. Homologinių chromosomų konjugacija yra vienas iš sudėtingiausių ir dar nepakankamai ištirtų reiškinių. Šiuo metu vis labiau įsigali nuomonė, kad homologinės chromosomos konjuguoja ir somatinėse ląstelėse, tik kitokiu būdu.

Vykstant mejozei, somatinį chromosomų poravimąsi laipsniškai keičia mejozinis poravimasis. Mejozėje homologinių chromosomų konjugacija yra dėsningas reiškinys. Homologinės chromosomos konjuguoja visu ilgiu labai tiksliai – lokusas į lokusą.

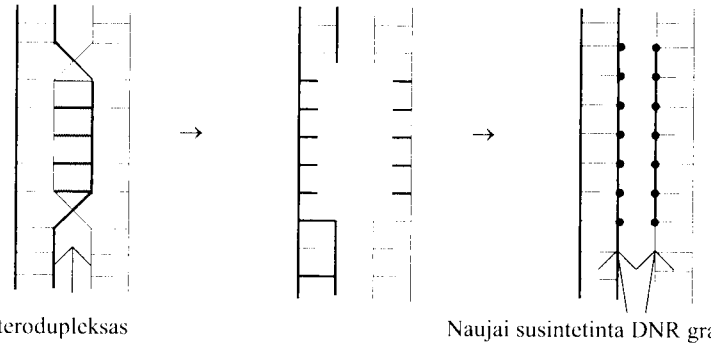
Tuo įsitikinta ištyrus chromosomų mutacijas (žr. 6.15 pav.). Kai vienoje iš homologinių chromosomų įvyksta mutacija, o kitoje chromosomoje lokusų tvarka lieka nepakitusi, mejozės I dalijimosi zigotenos-pachitenos stadijose susidaro sudėtingos kilpos, kryžiai, žiedai ir kt. figūros, kad konjugacija vyktų lokusas į lokusą. Iš jų pobūdžio galima nustatyti chromosomų mutacijos tipą. Vadinasi, chromosomų homologija yra pagrindinis sinapsės veiksnys. Ir čia homologinės chromosomos visiškai pateisina savo pavadinimą.

Tačiau būdas, kuriuo viena homologinė chromosoma sąveikauja su kita homologine chromosoma, yra labai sudėtingas. Pirmiausia kyla klausimai:

- nuo ko prasideda konjugacija, kaip homologinės chromosomos suranda viena kitą, kokia konjugacijos pradžia;
- kaip I zigotenoje susidaro ryšys tarp homologinių chromosomų per visą ilgį?

Pradinis kontaktas tarp homologinių chromosomų. Zigoteninė ir pachiteninė DNR. Aptikta DNR, kurios replikacija yra neplaninė, vyksta zigotenoje. Ši DNR buvo pavadinta zigotenine DNR (arba zyDNR). Ji sudaro 0,3% viso genomo, kiekviena seka 5–10 kb, jose daug G-C porų.

Zigoteninės DNR atradimas paskatino pasiūlyti hipotezę, pagal kurią pirminis kontaktas tarp homologinių chromosomų atsiranda zigoteninės DNR vietose. Tarp DNR molekulių susidaro „hibridinė" DNR – **heterodupleksas**. Heterodupleksais, kaip užtrauktuku sukabinamos dvi homologinės DNR molekulės. Pradėjus formuotis sinaptoneminiam kompleksui, heteroduplekso DNR suyra, trūkio vietos užpildomos reparacinės DNR sintezės būdu (tai ir yra toji neplaninė zyDNR sintezė):

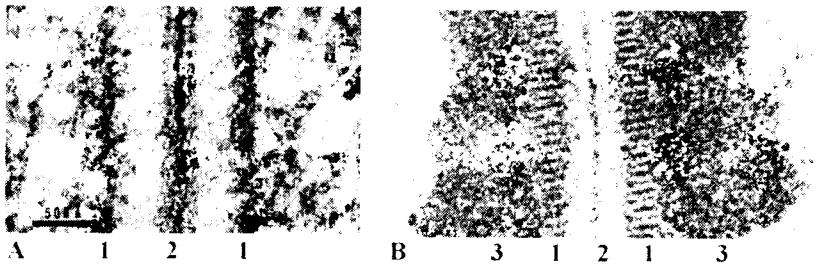


Pachiteninė DNR (pDNR) – dar vienas nukleotidų sekų tipas, kurio neplaninė sintezė, kaip pavadinimas rodo, vyksta pachitenoje, kai sinaptoneminis kompleksas jau susiformavęs. Tai neturi jokios reikšmės homologinių chromosomų konjugacijos pradžiai. Pachiteninė DNR sudaro 0,1% viso genomo, sekos 800–3000 bp ilgio, nesiskiria nuo likusios DNR dalies.

Nustatyta, kad zyDNR ir pDNR svarbios DNR reparacijai.

Sinaptoneminis kompleksas. Pachitenoje homologinės chromosomos sujungtos (arba atskirtos viena nuo kitos) sinaptoneminio komplekso (9.5 pav.). Jis trukdo chromosomoms sulipti ir sudarytas iš trijų lygiagrečiai su chromosomomis einančių **ašių** (elementų): **dviejų šoninių ir centrinės**, kurias su chromosomomis ir tarpusavyje jungia **skersinės skaidulos**.

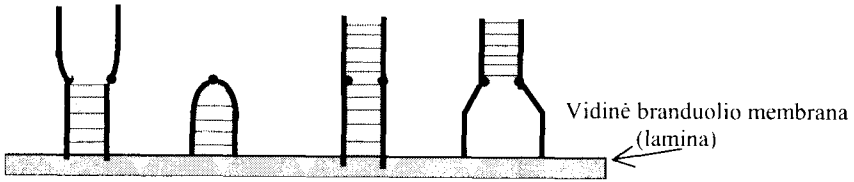
Kiekviena šoninė ašis sąveikauja tik su viena homologine chromosoma. Sinaptoneminis kompleksas (SK) susidaro iš branduolio mat-



9.5 pav. **Sinaptoneminis kompleksas:**
A, B – įvairių organizmų sinaptoneminio komplekso sandara skiriasi: *A* – svirplio (*Gryllus argentinus*), *B* – grybo (*Neotiella*); *1* – šoninė ašis, *2* – centrinė ašis, *3* – chromosoma (*A* – iš R. Wettstein, J. R. Sotelo, 1970; *B* – iš D. von Wettstein et al., 1984)

rikso baltymų. Galais jis prisitvirtina prie branduolio membranos. SK laiko homologines chromosomas gana dideliu atstumu vieną nuo kitos: 240–300 nm. SK nuo ankstyvosios diplotenos pradeda nykti ir visiškai išnyksta diplotenos pabaigoje.

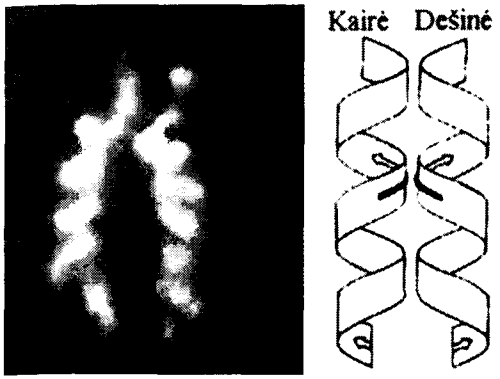
Homologinių chromosomų sinapsės pradžia. Homologinės chromosomos suartėja savo telomeriniais galais ant vidinės branduolio membranos. Šie galai įmerkti į tankiąją plokštelę (laminą). Tai įrodyta ištyrus izochromosomas, kurios gali įvairiais būdais konjuguoti, net vienas chromosomos petys su kitu, nes pečiai yra vienas kitam homologiški. Kad ir kaip jos būtų konjugavusios, du jų galai įmerkti į vidinę branduolio membraną:



Daugelio organizmų mejozinės chromosomos prisitvirtinusios prie ribotos branduolio apvalkalėlio srities ir sudaro puokštę. Puokštė susidaro vėlyvoje leptotenoje ir išlieka zigotenoje. Kai kurių organizmų chromosomos prisitvirtina prie branduolio apvalkalėlio, ir po to juda ieškodamos viena kitos.

Kontakto vietoje aptikta baltymų, svarbių chromosomos sandarai (ScI, ScII). Mielių chromosomų galuose irgi aptikta baltymų (Taml, Ndj1), kuriuos lemiančių genų mutacijos slopina sinapsę. Tai geriausiai įrodo, kad pradinio kontakto vietoje būtini specialūs baltymai.

Šoninės ašys ir seserinių chromatidžių jungtis. Ir mitozėje po DNR replikacijos iki metafazės, kai aiškiai matyti dvi atsiskyrusios,



9.6 pav. **Ryšys tarp seserinių chromatidžių** (remiantis N. Kleckner, 1996)

tik centromerų sulaikomos chromatidės, praeina daug laiko. Šį laikotarpį dukterinės chromosomos laikosi kartu visu savo ilgiu. Be to, patiria laipsnišką ir sinchronišką kondensaciją. Nustatyta, kad chromatidės viena kitos atžvilgiu orientuotos veidrodiniu būdu (9.6 pav.). Šonuose išsidėsčiusios kilpos. Jos didėja didėjant mitozinių ir mejozinių chromosomų kondensacijai.

Taigi chromonemos kilpos (domenai) yra nukreiptos į šonus, o chromatidės pastoliai (karkasas) – į vidų. Chromatides vienija jungtys. Manoma, kad, joms šonais susiliejus, susidaro sinaptoneminio komplekso šoninės ašys.

Ryšys „veidu į veidą“ tarp seserinių chromatidžių mitozėje keičiamas į ryšį „šonas prie šono“ tarp homologinių chromosomų mejozėje.

Po to galutinai susidaro šoniniai elementai, kiek vėliau ir centrinis elementas.

Didelė organizmų įvairovė labai apsunkina mejozės tyrimus. Kai kurių organizmų homologinės chromosomos pradeda poruotis tik tam tikrose vietose – centruose. Antai kiekviena nematodo *Caenorhabditis elegans* chromosoma turi tik po vieną tokį centrą. *Saccharomyces cerevisiae* chromonemoje yra 190 poravimosi vietų (kas 65 kb). **Specialūs poravimosi centrai** aptikti ir drozofilos chromosomose, išskyrus ketvirtąją.

Rekombinaciniai mazgeliai. Ant sinaptoneminio komplekso (pachitenoje) centrinės ašies buvo aptikti nedidučiai (90 nm) mazgeliai. Jų padėtis ir skaičius sutapo su chiazmų ir krosingoverio vietomis bei dažniu, todėl jie net be jokių kitų tiesioginių įrodymų pavadinti rekombinaciniais mazgeliais. Šie mazgeliai sudaryti iš baltymų. Sutampa vieta rekombinacinių mazgelių ir tų DNR segmentų, kurių replikacija vyksta zigotenoje-pachitenoje.

Visi pagrindiniai mejozės tikslai:

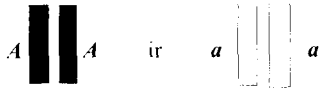
- taisyklingas homologinių chromosomų paskirstymas,
- krosingoveris ir genų konversija,
- chromosomos sandaros pažaidų pašalinimas (reparacija) ir sandaros kontrolė vyksta vienu metu ir yra bendros priežasties sukelti reiškiniai.

9.3. Požymių paveldėjimas ir diploidiškumas

9.3.1. Vienos chromosomų/genų poros paveldėjimas

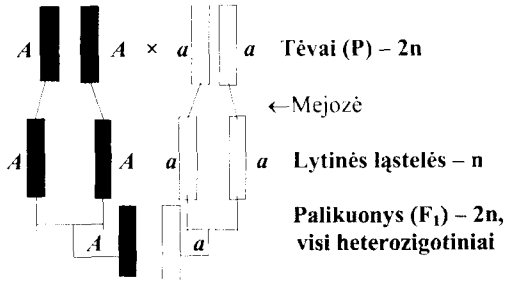
Keletas gyvūnų turi tik vieną chromosomų porą, tarp jų ne kartą minėta askaridė *Ascaris megalocephala*, kurios generatyvinėse diploidinėse ląstelėse yra po dvi chromosomas. Tarkime, kad toks gyvūnas yra ne hermafroditas (dauginasi įvaisos, arba inbrydingo, būdu), o dauginasi susiliejant dviejų organizmų lytinėms ląstelėms (autbrydingo būdu).

Genų poros paveldėjimas, kai abu tėvai homozigotiniai. Tėvai gali būti įvairių genotipų. Sutarkime, kad analizuosime tik vieną alelinių genų porą, ir kiekvieno iš tėvų abiejose homologinėse chromosomose yra po tokį patį alelį, tik skirtingą *AA* ir *aa*. Tėvai atrodytų taip:



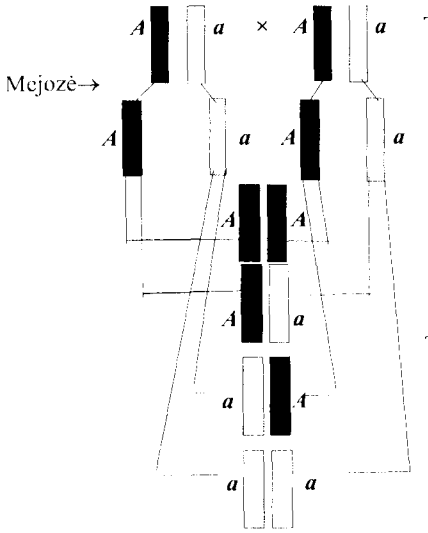
Pagal daug kartų minėtą apibūdinimą abu tėvai yra homozigotiniai.

Lytinių ląstelių genetines ypatybes lemia mejozė. Diploido generatyvinės ląstelės virsta haploidinėmis:



Čia pavaizduotos ne tik tėvų lytinės ląstelės, bet ir palikuonių genotipas šioms ląstelėms susiliejus, kai atsikuria diploidinis chromosomų skaičius.

Genų poros paveldėjimas, kai abu tėvai yra heterozigotiniai (genetinėje analizėje pagal Mendelį tai atitiktų pirmąją hibridų kartą – F_1):



Tėvų porų įvairovė. Tėvų poros gali būti įvairių genotipų:

- **homozigotos** *AA×AA, aa×aa, AA×aa;*
- **heterozigotos** *Aa×Aa;*
- **homozigota su heterozigota** *Aa×AA, Aa×aa.*

Nuo tėvų genotipų priklauso fenotipų įvairovė. Ją dar padidina alelinių genų sąveikos pobūdis (9.1 lentelė).

Iš tikrųjų fenotipų įvairovė dar didesnė, negu nurodyta 9.1 lentelėje, nes fenotipą (požymį) dažnai nulemia ne vienas, o daug genų. Ji priklauso ne tik nuo alelinių, bet ir nuo nealelinių genų sąveikos.

Genotipas ir fenotipas, jų žymėjimas. Kai genetinės linijos ar veislės kryžminamos dirbtinai, tėvus galima parinkti.

Klasikiniu genetinės analizės atveju kryžminami homozigotiniai organizmai. Jie (tėvai) žymimi raide **P** (lot. *parentes* – tėvinis). Jų palikuonių kartos žymimos **F** (lot. *filii* – vaikai) su atitinkamais skaitiniais indeksais: $\mathbf{F_1}$ – pirmoji, $\mathbf{F_2}$ – antroji, $\mathbf{F_3}$ – trečioji ir t. t. hibridų kartos. F_1 reiškia pirmoji hibridų karta, todėl prie F_1 daugiau

9.1 lentelė. **Palikuonių genotipai ir fenotipai, esant įvairiems tėvų genotipams ir įvairiai alelinių genų sąveikai**

Tėvų genotipai	Palikuonių genotipai: genotipo formulė	santykis	fenotipai: konkretus fenotipas (požymis)	santykis
	A. Visiškas dominavimas			
AA×*AA*	*AA*	1	dominuojantis – A	1
AA×*Aa*	*AA, Aa*	1:1	dominuojantis – A	1
Aa×*Aa*	*AA, Aa,aa*	1:2:1	dominuojantis/recesyvusis – A ir a	3:1
AA×*aa*	*Aa*	1	dominuojantis – A	1
Aa×*aa*	*Aa, aa*	1:1	dominuojantis/recesyvusis – A ir a	1:1
aa×*aa*	*aa*	1	recesyvusis – a	1
	B. Nevisiškas dominavimas			
AA×*AA*	*AA*	1	dominuojantis* – A	1
AA×*Aa*	*AA, Aa*	1:1	dominuojantis*/tarpinis – A ir T	1:1
Aa×*Aa*	*AA, Aa, aa*	1:2:1	dominuojantis*/tarpinis/recesyvusis – A, T ir a	1:2:1
AA×*aa*	*Aa*	1	tarpinis – T	1
Aa×*aa*	*Aa, aa*	1:1	tarpinis/recesyvusis – T ir a	1:1
aa×*aa*	*aa*	1	recesyvusis – a	1
	C. Kodominavimas			
$A^1A^1 \times A^1A^1$	A^1A^1	1	A^1	1
$A^2A^2 \times A^2A^2$	A^2A^2	1	A^2	1
$A^1A^1 \times A^2A^2$	A^1A^2	1	A^1A^2	1
$A^1A^1 \times A^1A^2$	A^1A^1, A^1A^2	1:1	A^1, A^1A^2	1:1
$A^1A^2 \times A^2A^2$	A^2A^2, A^1A^2	1:1	A^2, A^1A^2	1:1
$A^1A^2 \times A^1A^2$	A^1A^1, A^1A^2, A^2A^2	1:2:1	A^1, A^1A^2, A^2	1:2:1
$A^1A^1 \times A^1a$	A^1A^1, A^1a	1:1	A^1	1
$A^2A^2 \times A^2a$	A^2A^2, A^2a	1:1	A^2	1
$A^1A^1 \times A^2a$	A^1A^2, A^1a	1:1	A^1A^2, A^1	1:1
$A^2A^2 \times A^1a$	A^2A^1, A^2a	1:1	A^1A^2, A^2	1:1
$A^1a \times A^2a$	A^1A^2, A^1a, A^2a, *aa*	1:1:1:1	A^1A^2, A^1, A^2, a	1:1:1:1
$A^1A^1 \times aa$	A^1a	1	A^1	1
$A^2A^2 \times aa$	A^2a	1	A^2	1
$A^1A^2 \times aa$	A^1a, A^2a	1:1	A^1, A^2	1:1
$A^1a \times aa$	A^1a, *aa*	1:1	A^1, a	1:1
$A^2a \times aa$	A^2a, *aa*	1:1	A^2, a	1:1
aa×*aa*	*aa*	1	a	1
	D. Superdominavimas (panašiai kaip nevisiško dominavimo)			

* Dažnai sunku nuspręsti, kuris alelis dominuojantis, o kuris recesyvusis ir nustatomas pagal susitarimą. T – tarpinis fenotipas, A – dominuojantis požymis, a – recesyvusis požymis, palikuonių santykis nurodytas ta pačia tvarka, kaip pateikiami genotipai arba fenotipai. Paryškinta heterozigotinės poros ir jų palikuoniai.

jokių žodžių iš šios tirados rašyti nereikia (dažna klaida). Kai turima omenyje pačius organizmus, rašoma $\mathbf{F_1}$ hibridai ir pan. Žymėti F_1, F_2 vietoj „pirmoji hibridų karta“, „antroji hibridų karta“ labai patogu. Prisiminkime ir tai, kad užrašant genetinės analizės rezultatus pirmasis nurodomas motininis individas, antrasis – tėvinis,

todėl lytį žyminčių ženklų gali ir nebūti. Didžiosiomis raidėmis žymimi dominuojantys, mažosiomis – recesyvieji (lot. *recessus* – atsitraukimas) genai.

Fenotipų analizė yra kur kas sudėtingesnė. Reikia įsigilinti į geno veiklos (ekspresijos) esmę, kaip šis genas sąveikauja su kitais genais, su genotipine aplinka ir įvairiais vidinės bei išorinės aplinkos veiksniais.

Paprasčiausią atvejį buvo aptikęs Mendelis:

vienas alelis visiškai slopino kitą alelį

dominuojantis ⟶ recesyvųjį.

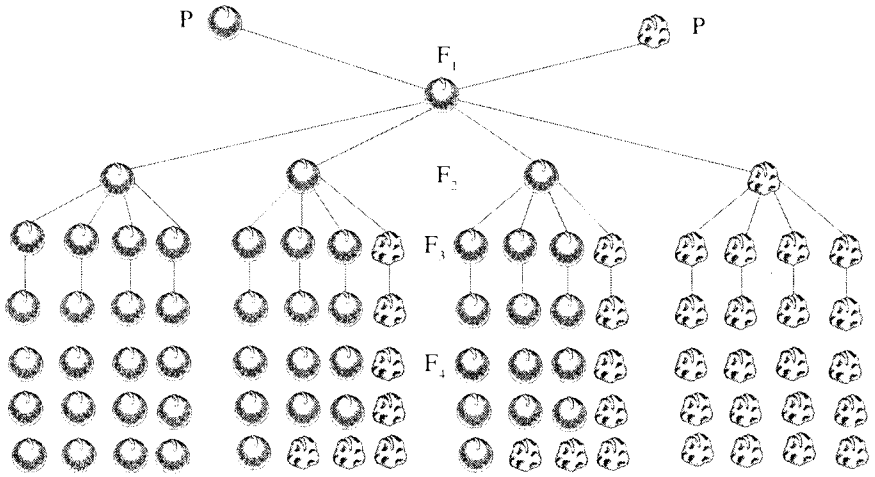
Iš Mendelio bandymų su žirniais:

Požymis/alelis	dominuojantis	recesyvusis
Sėklų spalva	geltona	žalia
Sėklų forma	lygi	raukšlėta
Vainiklapių spalva	violetinė	balta
ir kt.		

Kai vienas alelis visiškai slopina kitą alelį (kaip Mendelio bandymuose), heterozigotos (*Aa* tipo) visiškai nesiskiria nuo homozigotų, kurių genotipe abu aleliai dominuojantys (*AA*). Pvz., žirnių homozigotos (*AA*) ir heterozigotos (*Aa*) yra vienodos. Jeigu tai sėklų formos genai, tai homozigotos *AA* ir heterozigotos *Aa* yra vienodos formos (9.7 pav.).

Vadinasi, šiuo atveju negalima iš fenotipo spręsti apie organizmo genotipą. Reikia atlikti tolesnę palikuonių analizę. Antai (9.7 pav.) vienų F_2 su lygiomis sėklomis augalų palikuonys F_3 buvo tik su lygiomis sėklomis. Jų genotipas buvo *AA* – homozigotinis. Tarp kitų buvusių F_2 lygiomis sėklomis augalų F_3 atsirado palikuonys tiek su lygiomis (jų dauguma – ¾), tiek su raukšlėtomis sėklomis (jų – ¼). Jų genotipas buvo *Aa* heterozigotinis. O visų augalų, kurių sėklos buvo raukšlėtos, genotipas homozigotinis (*aa*). Tai patvirtina ir F_4 analizė. Taigi taisyklė tokia:

> Recesyvusis genas gali pasireikšti fenotipe tik homozigotinės būklės ***aa***. Vadinasi, tipišku atveju iš recesyviojo fenotipo galima spręsti, kad genotipas yra homozigotinis su abiem recesyviaisiais aleliais (***aa***).



9.7 pav. **Monohibridinio kryžminimo rezultatai 4 hibridų kartose:** *P* – tėvinės formos; F_1, F_2, F_3, F_4 - hibridų kartos

Šia taisykle labai dažnai naudojamasi genetikoje, ypač atliekant populiacijų tyrimus. Tačiau kiekviena taisyklė turi išimčių. Homozigotų pagal recesyvųjį geną *aa* **išimtys** atsiranda dėl

- sąveikos su nealeliniais genais,
- aplinkos veiksnių poveikio.

Tačiau tipiškas požymio paveldėjimas pagal Mendelį yra labai supaprastintas. Net paprasčiausio požymio genetika yra labai sudėtinga, požymį lemia daug genų. Prisiminkime, kad gana paprasto metabolito (pvz., pigmento) sintezę lemia daugelis vienas paskui kitą veikiančių genų, ir paprasčiausias geno produktas dažnai yra netgi ne fermentas, o polipeptidas. Fermentas gali būti kelių genų produktas (kaip DNR polimerazė III arba α). Tai pagrindiniai genai, o kur dar kiti papildomieji genai (žr. toliau).

Būtina kiekvieną požymį gerai genetiškai ištirti. Imkime pavyzdį. Buitiškai ir apie mėlynakius žmones galima būtų pasakyti, kad jie yra homozigotiniai *aa*. Tačiau nealelinių genų sąveika ima ir iškrečia nemalonų pokštą: dviejų mėlynakių (abu *aa*) vaikas retai, bet gali būti, pvz., rudakis. Pasirodo, reikia atidžiai apžiūrėti tėvų akis. Jeigu nors vieno mėlynakio tėvų akys mėlynos su rudais (ar kitokiais taškeliais), gali gimti vaikas, neatitinkantis recesyviojo geno paveldėjimo taisyklės:

Tėvai ***aa×aa***

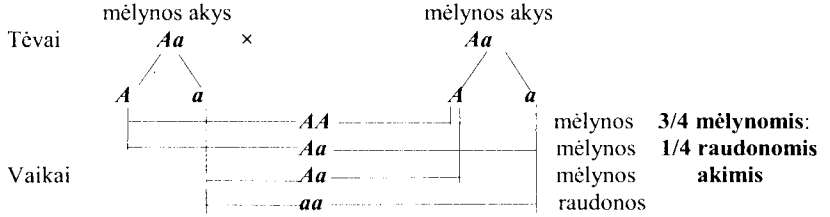
Visi vaikai (arba jų dalis) ***aa*** ≠ (ne su recesyviuoju požymiu).

Tiksliau, jų genotipai iš tikrųjų yra *aa*, bet tie *aa* gali būti skirtingi a_1a_1 ir a_2a_2, nes pigmento stoką gali lemti skirtingų, nealelinių, veikiančių vienas paskui kitą genų, mutacijos (žr. toliau komplementacija) arba dar yra papildomų nealelinių genų, veikiančių fenotipą.

Su mėlynomis akimis dar ne viskas. Šį požymį lemiantis genas gali būti dominuojantis, jeigu analizuojamas dviejų alelių, lemiančių

- mėlyną akių spalvą,
- raudoną akių spalvą

paveldėjimas. Mat raudona akių spalva yra absoliučiai recesyvusis požymis. Jokio akių pigmento nesusidaro, spalvą suteikia kapiliarų tinklas. Nors tai retas įvykis, bet dviejų mėlynakių pora gali būti ne homozigotinė, o heterozigotinė (pagal dominuojančiojo geno formulę):



Taigi buvo galima įsitikinti, kad palikuonių **fenotipas** (požymis) priklauso:

- nuo tėvų genotipo (9.1 lentelė),
- kiek požymį lemiantis genas turi alelių (ar yra polialelizmas),
- kokie yra santykiai heterozigotose tarp alelių ir su kitais genais.

Genetinę analizę komplikuoja tai, kad

- dažniausiai tą patį požymį lemia keli nealeliniai genai,
- tarp nealelinių genų irgi vyksta sąveika. Ji lemia labai didelę fenotopų įvairovę.

Kokie santykiai tarp alelinių ir nealelinių genų, kurie aleliai dominuojantys, o kurie recesyvieji, – visa tai nustatoma (kur tai įmano-

37. 1313

ma) tiesiogiai – hibridologiniu metodu (žr. I sk.). Kur tai neįmanoma, sprendžiama iš genealogijų tyrimų, t. y. taikomas genealoginis metodas (žr. I sk.).

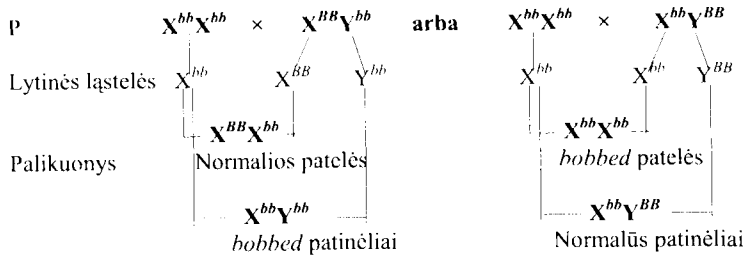
9.3.2. Lytinėse chromosomose esančių genų paveldėjimas

Ypatingu būdu paveldimi genai, esantys lytinėse chromosomose, kai yra heterogametinė (XY) lytis. Galimi trys atvejai:

- genas yra X ir Y chromosomose,
- genas yra tik X chromosomoje,
- genas yra tik Y chromosomoje.

Pseudoautosominiai genai. Kitaip paveldimi net tie genai, kurie yra **abiejose – X ir Y chromosomose**. Šie genai vadinami **pseudoautosominiais**. Toks, pvz., yra drozofilos genas *bobbed* (*bb*). Tai recesyvusis genas. Homozigotinėje būklėje *bb* kūną dengiantys šereliai yra plonesni ir trumpesni. Genas yra branduolėlio organizatoriuje, t. y. ten, kur susikaupę rRNR genai.

Sukryžminus homozigotines *bb bb* pateles su heterozigotiniais patinėliais *BB bb*, išryškėja skirtumai tarp šių pseudoautosominių ir tikrų autosominių genų. Palikuonių požymiai priklauso nuo to, kurioje tėvo – X ar Y – chromosomoje buvo dominuojantysis alelis:



Čia viskas būtų kaip „pagal Mendelį", tik atsiranda sąsaja su lytimi: kurios lyties – patelės ar patinėlio fenotipas recesyvusis (nagrinėtu atveju mutantinis *bobbed*), o kurios lyties – su dominuojančiu (normaliu) požymiu.

Diferenciniai segmentai. X ir Y chromosomų segmentai, neturintys homologų priešingoje chromosomoje, vadinami diferenciniais segmentais. Juose lokalizuotų genų paveldėjimas ir pasireiškimas irgi susiję su lytimi, bet kitaip negu pseudoautosominių genų.

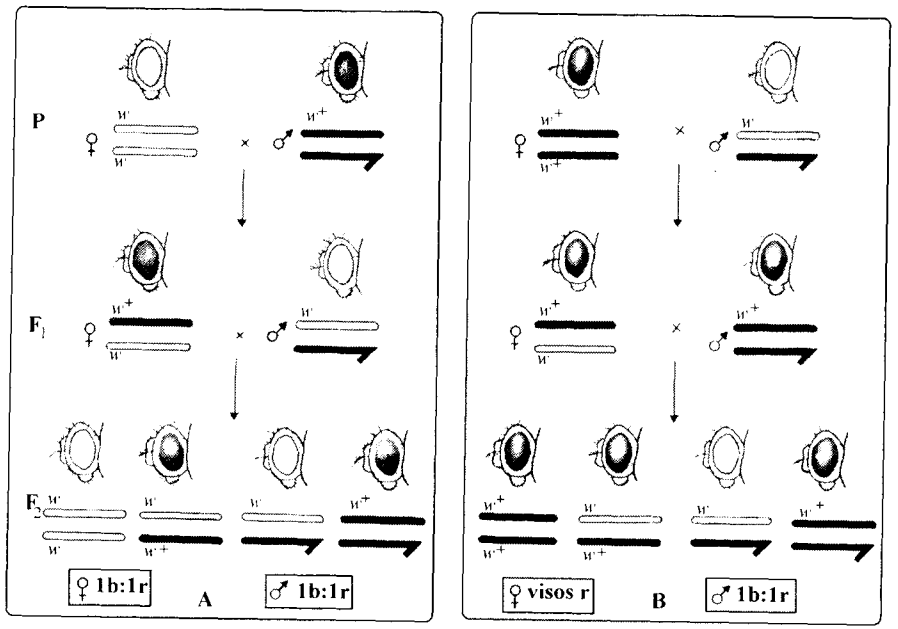
Genai, kurie yra tik Y chromosomoje. Holandriniai požymiai. Kadangi juos lemiantys genai yra tik Y chromosomoje, šeimoje šiuos genus paveldi **visi vyriškos lyties individai *be išimties***. Vadinasi, jeigu Y chromosomoje yra genas, šeimoje jį paveldi visi berniukai: tie, kurie paveldi Y chromosomą, paveldi ir joje esančius vyriškąją lytį lemiančius genus. Požymiai, kuriuos lemiantys genai yra tik Y chromosomoje, vadinami **holandriniais**.

Pavadinimas kilęs nuo vienos garsios Olandijos aristokratų šeimos, kurioje pirmą kartą susidurta su tokiu požymio paveldėjimu. Visų šeimos vyrų etiketė – plėvė tarp II ir III kojos pirštų. Pagal genealogiją šioje šeimoje jau per 800 metų šis genas yra paveldimas kaip holandrinis, t. y. jį paveldi visi berniukai. Tačiau kitose šeimose šis požymis aiškiai paveldimas ne per lytines chromosomas. Gali būti, kad vieno kurio protėvio kariotipe įvyko translokacija iš autosomos į Y chromosomą. Tai visiškai įmanoma. Prisiminkime šilkverpio kiaušinėlių spalvos genus (žr. p. 435), kurie dirbtinai iš autosomų buvo perkelti (translokuoti) į lytinę chromosomą, ir šilkverpio lytį buvo galima numatyti iš kiaušinėlių spalvos. Nors kitose šilkverpio linijose, be translokacijos, genas yra įprastoje vietoje – autosomoje.

Geno vieta chromosomoje yra tik santykinai pastovi.

Genai, kurie yra tik X chromosomoje. „Sukibę" su lytimi požymiai. Šių požymių paveldėjimas buvo išaiškintas dar tuo metu, kai iš viso apie paveldėjimo dėsnius, juo labiau apie chromosomas, nieko nebuvo žinoma. Prieš tūkstančius metų jau buvo žinoma, kad hemofiliją (kraujo nekrešėjimą) berniukai paveldi iš sveikų motinų. Hemofilija sergančių moterų labai reta. Panašiai paveldimas daltonizmas (spalvų neskyrimas). Moterims daltonizmas pasireiškia dažniau – 0,5%, tačiau vyrų daltonikų yra apie 10%, t. y. 20 kartų daugiau.

Šių požymių paveldėjimo ir pasireiškimo esmę atskleidė Morganas ir jo bendradarbiai, tirdami drozofilos raudoną ir baltą akių spalvas. Akių spalvos paveldėjimas irgi priklauso nuo lyties: vyriškoje lytyje recesyvusis genas pasireiškia dažniau (9.8 pav.), bet tai susiję ne su Y, o su X chromosoma. Joje yra genai, kuriems nėra homologo Y chromosomoje. Vyriškoje lytyje šie genai yra **hemizigotinėje** būklėje, kaip ir genai, kurie yra tik Y chromosomoje. Genai, esantys diferenciniuose X chromosomos segmentuose, ir jų lemiami požymiai Morgano buvo pavadinti „sukibusiais" su lytimi. Pažymėtina, kad jie nėra nei antriniai, nei juo labiau pirminiai lytiniai požymiai. Vienintelė priežastis, kodėl tie požymiai susiję su lytimi, yra šių genų



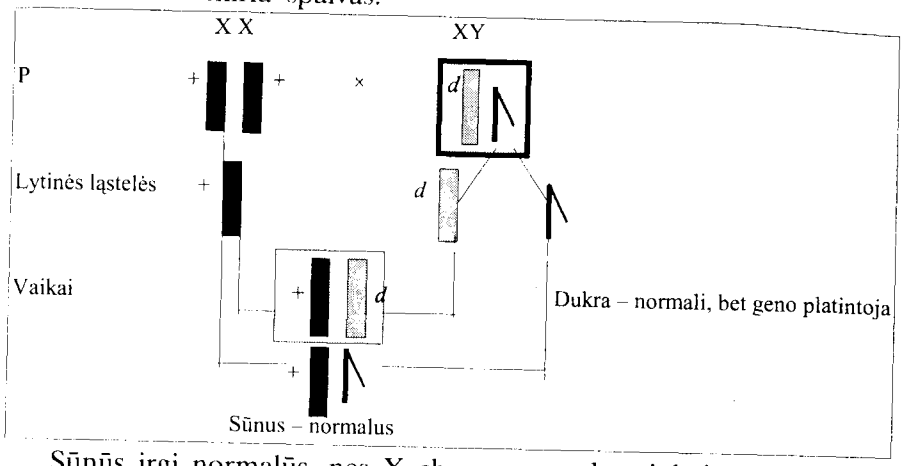
9.8 pav. **„Sukibusio" su lytimi drozofilos geno *white* (*w*) paveldėjimas:** *A* – baltaakė patelė poruojama su normalios akių spalvos patinėliu; *B* – normalios akių spalvos patelė poruojama su baltaakiu patinėliu; *r* – raudonomis, *b* – baltomis akimis

vieta X chromosomoje. Jau dabar šioje žmogaus chromosomoje žinoma daugiau kaip 100 genų.

Hemizigotinė būklė susidaro ne tik dėl diferencinių segmentų X ir Y chromosomose, bet ir dėl haploidijos (tik vienas chromosomų rinkinys), monosomijos (tik viena chromosoma iš homologinių chromosomų poros), delecijų (vienoje chromosomoje iškritęs segmentas, kitoje homologinėje chromosomoje šis segmentas išlikęs). Taigi analogiškai homozigotai ar heterozigotai genetikoje skiriama **hemizigota** (gr. *hemi* – pusiau). Tai organizmas (arba ląstelė), kuriame yra tik vienas alelis vietoj alelių poros. Kadangi vyriškoji lytis turi tik vieną X chromosomą, visi joje esantys genai, kurių nėra Y chromosomoje, pasireiškia fenotipe nepriklausomai nuo to, ar jie dominuojantys, ar recesyvieji.

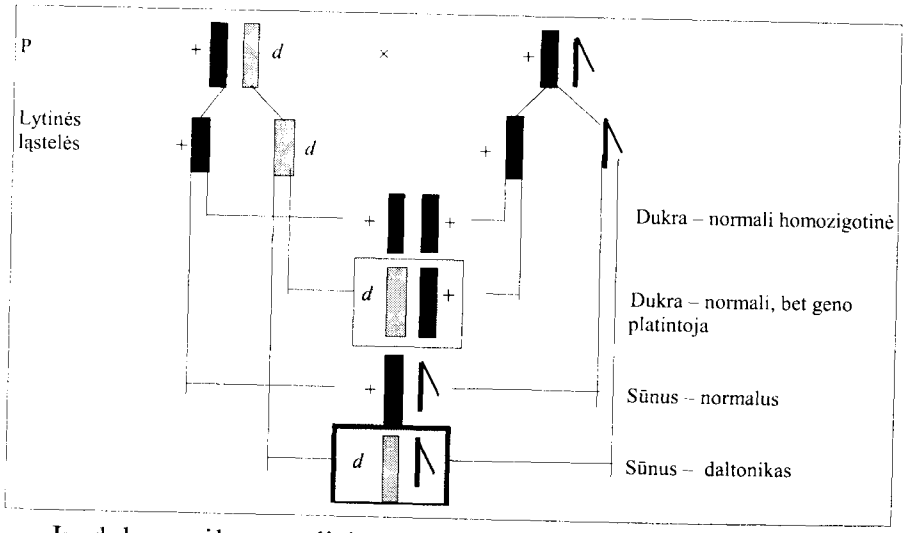
Išnagrinėkime, pavyzdžiui, kaip paveldimas recesyvusis „sukibęs" su lytimi požymis daltonizmas. Jis pasirinktas todėl, kad jo genai dažnesni, taip pat realūs įvairūs genotipai bei poros.

Šeimoje, kurioje moteris yra homozigotinė ir normaliai skiria spalvas (++), o tėvas daltonikas (*dY*), visos dukros yra heterozigotinės, bet normaliai skiria spalvas:



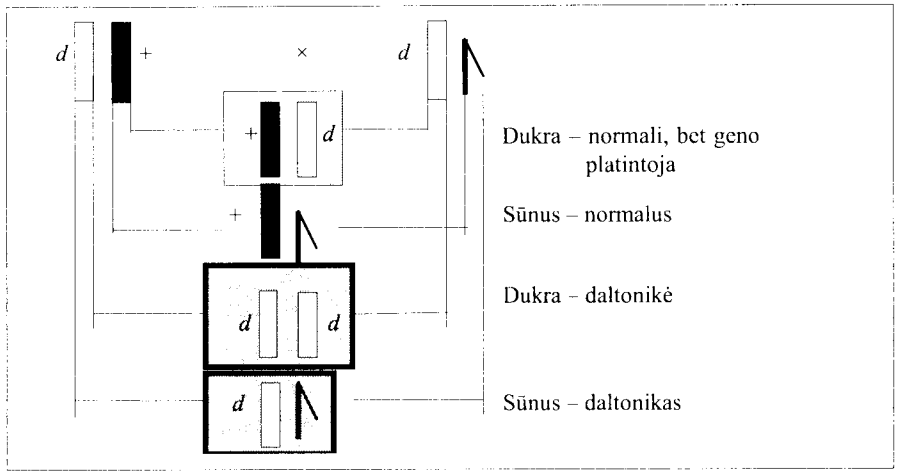
Sūnūs irgi normalūs, nes X chromosomą berniukai paveldi tik iš motinos.

Tarkime, kad šioje šeimoje dukra (+*d*) išteka už normaliai spalvas skiriančio vyro (+*Y*):



Jų dukros vėl normaliai skiria spalvas, tačiau pusė jų sūnų, kurie iš motinos paveldėjo X chromosomą su daltonizmo genu, yra daltonikai. Taip požymį iš senelio per dukras paveldi vyriškos lyties anūkai. Toks požymių paveldėjimas kartais vadinamas **kryžmišku**.

Daltonikės mergaitės gimsta šeimoje, kurioje daltonikas tėvas (*dY*) yra susituokęs su heterozigotine moterimi (+*d*). Šioje šeimoje pusė berniukų ir mergaičių yra daltonikai:



Tokios santuokos tikimybė priklauso nuo geno dažnio populiacijoje: kuo genas retesnis, tuo mažesnė tikimybė, kad gims homozigotinės mergaitės ir požymis išryškės moterų fenotipe. Dėl to hemofilija tarp moterų yra išimtinis, o daltonizmas, nors ir gerokai rečiau negu tarp vyrų, vis dėlto įmanomas įvykis. Mat daltonizmo genai yra paplitę populiacijoje.

Dominuojantys „sukibę" su lytimi požymiai, atvirkščiai, dažniau pasireiškia tarp moterų. Pavyzdžiui, normalus spalvų skyrimas, paveldimi defektai – neorganinio fosforo stoka kraujyje, dėl to išsivysto rachitas arba dantų emalio defektas, dėl kurio patamsėja dantys.

9.4. Eukariotų genomo fragmentacija į chromosomas ir genų/požymių paveldėjimas

Eukariotų genomas skiriasi nuo prokariotų genomo daugeliu ypatybių (žr. 3.1. sk. ir 3.1 lentelę), tačiau genų/požymių paveldėjimui svarbiausios, lemiančios yra dvi:

- **diploidiškumas**;
- **genomo susiskaidymas į atskirus fragmentus – *chromosomas*.**

Eukariotų genomo fragmentacija į didesnį ar mažesnį chromosomų skaičių padiktuoja savas „žaidimo" taisykles. Galimi du nealelinių genų paveldėjimo atvejai:

- skirtingi, nealeliniai genai yra skirtingose, nehomologinėse chromosomose,
- nealeliniai genai yra toje pačioje chromosomoje.

Pirmuoju atveju genai/požymiai paveldimi nepriklausomai, antruoju atveju genai yra sukibę.

Mendelis nustatė, kad požymiai paveldimi nepriklausomai vienas nuo kito. Ir tai vienas didžiausių Mendelio pasiekimų, vienas iš jo dėsnių. Tik vėliau buvo nustatyta, kad nepriklausomai paveldimi net ne genai, o chromosomos arba genai, kurie yra toje pačioje chromosomoje, bet nutolę, ir krosingoverio dažnis labai didelis.

Genų sankibą atrado Morganas ir iš karto išaiškino jo priežastį: genai, kurie yra toje pačioje chromosomoje, paveldimi kartu, sukibę.

Kad ir kaip toli būtų pažengę genetikos tyrimų metodai ir rezultatai, bet, pirma, eukariotų genetinė analizė hibridologiniu metodu yra neišvengiama norint nustatyti genų sąveiką ir paaiškinti fenotipų įvairovę palikuonių kartose ir kodėl atsiranda nauji fenotipai dėl genų sąveikos. Antra, neišvengiamai tenka kryžminti eksperimentinius, genetinius objektus ir jų rezultatus pritaikyti tiems objektams, kurių dirbtinai pagal pasirinktą planą kryžminti negalima. Tarp tokių objektų svarbiausias yra žmogus.

Kryžminimai, kuriuose tėvai skiriasi įvairiu genų skaičiumi arba analizuojamas įvairaus genų skaičiaus paveldėjimas, turi pavadinimus.

- **Monohibridinis** – vadinamas kryžminimas, kai tiriamas vienos alelinių genų poros paveldėjimas, heterozigota pagal vieną tiriamą alelių porą – **monohibridas**;
- **dihibridiniu** – dviejų nealelinių genų analizė, heterozigota pagal du tiriamus genus – **dihibridas**;
- **trihibridinis** – trijų nealelinių genų analizė, heterozigota pagal tris tiriamus genus – **trihibridas** ir t. t.;
- **polihibridinis** – kai nealelinių genų skaičius didelis, heterozigota pagal daug genų – **polihibridas**.

9.4.1. Nealeliniai genai – nehomologinėse chromosomose. Nepriklausomas požymių paveldėjimas

Dihibridinio kryžminimo analizė. Pradėkime nuo paprasčiausio: dviejų chromosomų porų. Vienoje jų yra lokusas *A(a)*, kitoje – *B(b)*. Tarkime, kad pasirinkti tyrimams hibridų tėvai yra homozigotiniai abiejose genų porose. Vieno jų genai dominuojantys $\frac{A}{A}\ \frac{B}{B}$, kito – recesyvieji $\frac{a}{a}\ \frac{b}{b}$.

Šią padėtį visiškai atitinka klasiškiausias Mendelio atliktas žirnių su geltonomis lygiomis ir žaliomis raukšlėtomis sėklomis kryžminimas. Tarkime, kad *A* – geltona spalva, *a* – žalia spalva, *B* – lygi forma, *b* – raukšlėta forma. Tada tėvai atrodys taip:

P $\frac{A}{A}\ \frac{B}{B}$ $\frac{a}{a}\ \frac{b}{b}$

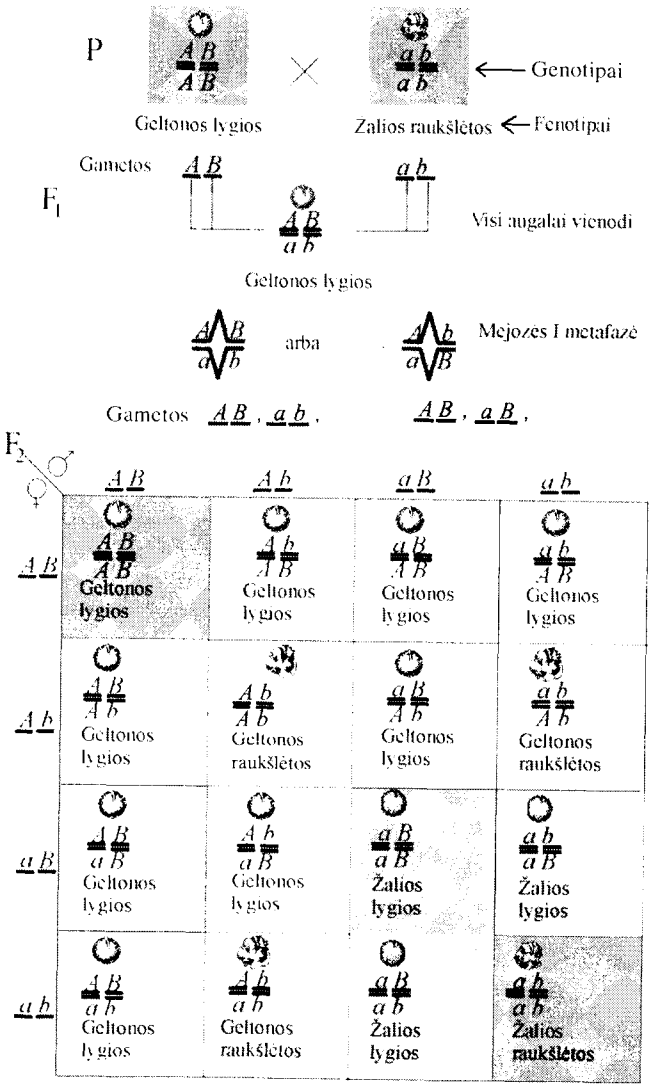
Geltonos lygios Žalios raukšlėtos

Pažymėta didžiosiomis ar mažosiomis raidėmis iš anksto žinant rezultatą. Paprastai apie šitaip pažymėtas genų savybes, sprendžiama iš F_1 (9.7 ir 9.9 pav.).

> Kai tėvai homozigotiniai, visi pirmosios kartos (F_1) hibridai yra vienodi, pasireiškia dominuojantys genai. Iš F_1 galima spręsti apie alelinių ir nealelinių genų sąveikos pobūdį.

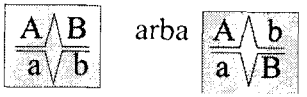
Lytinių ląstelių genotipai. Mejozė diploidines ląsteles paverčia haploidinėmis: homologinės chromosomos poruojasi ir iš kiekvienos homologinių chromosomų poros į priešingus polius keliauja po vieną homologinę chromosomą. Taigi kokių genotipų ir kokiu santykiu susidarys lytinės ląstelės, tipišku atveju (toks yra šis Mendelio bandymas) priklausys nuo tėvų genotipo. Kai abu tėvai homozigotiniai, visos jų lytinės ląstelės vienodos *AB* arba *ab*. Tačiau reikia paaiškinti, kodėl heterozigotinių pagal dvi genų poras F_1 hibridų lytinės ląstelės yra keturių tipų.

Pagrindinę chromosomų paskirstymo tvarką jau aptarėme: iš kiekvienos poros po vieną chromosomą. Ir jos laikomasi (9.9 pav.), tačiau homologinių chromosomų tarpusavio išsidėstymas mejozės I metafazėje yra atsitiktinis.



9.9 pav. **Dihibridinis kryžminimas. Žirnių sėklų spalvos paveldėjimas**

Todėl, kai tarpusavyje derinasi dvi chromosomų poros, galimos dvi jų padėtys I metafazės vidurio plokštumoje:



Abiejų šių padėčių tikimybė vienoda – 1:1, todėl ir dihibrido lytinės ląstelės yra keturių genotipų ir vienodu santykiu:

$$1AB : 1Ab : 1aB : 1ab$$

Iš genetikos mokslo „jaunystės" mūsų laikus yra pasiekęs labai patogus F_2 užrašymo būdas, pavadintas jį sugalvojusio anglų mokslininko Peneto (R. C. Punnett) vardu – **Peneto gardelė**, arba Peneto lentelė. Šis būdas ypač praverčia nagrinėjant sudėtingesnes genų sąveikas.

Peneto gardelė sudaroma taip: a) iš vieno taško nubrėžiamos dvi linijos: viena vertikaliai žemyn, kita statmenai pirmajai į dešinę pusę; b) ant vertikaliosios linijos surašomi moteriškų lytinių ląstelių genotipai ir jų santykinė dalis, o ant horizontaliosios – vyriškų lytinių ląstelių genotipai ir jų santykinė dalis; c) kiek yra vyriškų ir moteriškų lytinių ląstelių genotipų, tiek nubrėžiama horizontalių ir vertikalių linijų. Jų susikirtime susidaręs langelis yra atskiras zigotų derinys.

Žirnių F_1 hibridai abiejose genų porose heterozigotiniai, todėl jų lytinės ląstelės yra keturių tipų lygiu santykiu, vertikalių ir horizontalių linijų po keturias, langelių – 16. Tiek yra genotipų derinių F_2, atsižvelgiant ir į tai, iš ko – tėvo ar motinos – paveldimas genas. Tik (9.9 pav.) šalia lytinių ląstelių genotipų nenurodyti jų dažniai, nes visų tipų lytinių ląstelių yra po lygiai.

Kai reikia skaičiuoti galimų genotipų dažnius, ypač kai lytinių ląstelių dažniai skirtingi, šalia lytinių ląstelių genotipų būtina nurodyti jų dažnius.

Konkretaus genotipo zigotų dažnis yra lygus dažnių sandaugai tų lytinių ląstelių, kurioms susiliejus atsirado toks genotipas.

Taip apskaičiuojama tikimybė konkrečių genotipų palikuonims atsirasti. Pvz., tikimybė motinos lytinėms ląstelėms $AB = 0{,}25$ ir tėvo tokio pat genotipo lytinėms ląstelėms $AB = 0{,}25$. Sudauginę šias tikimybes ir sužinosime, kokiu dažniu gali būti palikuonių, kurių genotipas *AA BB*:

$$0{,}25 \times 0{,}25 = 0{,}0625, \text{ arba } \frac{1}{16}.$$

Toks šio genotipo zigotų dažnis surandamas ir iš žirnių F_2 hibridų Peneto gardelės (9.9 pav.).

Tačiau pateiktoje Peneto gardelėje yra išanalizuoti tik vieno tėvų genotipų derinio palikuonys: abu tėvai heterozigotiniai *Aa Bb*×*Aa Bb*. Gamtinėse populiacijose, tarp jų ir žmogaus, tėvų genotipai gali būti įvairūs. Net jeigu pratęstume žirnių hibridų tyrimus F_3, vien su homozigota ***AA BB*** gali būti šios tėvų poros: *AA BB* ir *AA BB*, *AA BB* ir *Aa BB*, *AA BB* ir *AA Bb*, *AA BB* ir *Aa Bb*, *AA BB ir AAbb*, *AABB ir aaBB*, *AA BB* ir *aa Bb*, *AA BB* ir *Aa bb*, *AA BB* ir *aa bb*. O kur kiti galimi deriniai? Kiekvienai iš šių porų galima apskaičiuoti palikuonių genotipų ir jų dažnių tikimybes aukščiau išdėstytu būdu. Taip ir daroma, kai tiriamos populiacijos.

Ta žirnių genotipų įvairovė, kurią nagrinėjome F_2, yra dirbtinai sukurta juos kryžminant. Jie yra savidulkiai augalai, ir jų įvairovę galima sukurti tik juos dirbtinai sukryžminus. Žmogaus genotipų įvairovė realiai egzistuoja dėl dauginimosi pobūdžio – laisvo poravimosi, autbrydingo. Žmogaus tėvinių porų, lytinių ląstelių ir jų palikuonių genotipų įvairovė labai didelė. Kokia ji teoriškai?

Polihibridiniai kryžminimai. Didelio (n) chromosomų skaičiaus deriniai. Mendelis įstengė atlikti tik trihibridinį kryžminimą, bet to pakanka bendroms paveldėjimo tendencijoms nustatyti, kai nepriklausomai paveldimas didelis (n) genų skaičius, tiksliau, kai tarpusavyje derinasi didesnis kaip 2 nehomologinių chromosomų porų skaičius.

Bendri genų paveldėjimo ir pasireiškimo hibridų kartose dėsningumai yra tie patys:

- pirmoji hibridų karta (F_1) vienoda;
- nuo F_2 palikuonys susiskaido į grupes.

Keičiasi:

- lytinių ląstelių ir zigotų (genotipų) derinių skaičius bei santykis;
- fenotipų grupių skaičius ir fenotipų santykis (apie tai toliau).

Hibridų (heterozigotų) lytinių ląstelių derinių skaičius kinta šitaip:

monohibrido (*Aa*) – 2 deriniai,
dihibrido (*Aa Bb*) – 4 deriniai,
trihibrido (*Aa Bb Cc*) – 8 deriniai
polihibrido (n) – 2^n derinių.

Iš tikrųjų tai ne genų, o diploidinio organizmo chromosomų deriniai, kur „n“ ir yra haploidinis chromosomų skaičius. Taigi maksimalus lytinių ląstelių derinių skaičius: žmogaus – $2^{23} = 8{,}4 \times 10^6$, drozofilos – $2^4 = 16$, kukurūzų – $2^{10} = 1024$. Iš tikrųjų derinių skaičius bus nepalyginimai didesnis dėl krosingoverio, kuris be didesnių išimčių turėtų vykti tarp visų toje pačioje chromosomoje esančių sukibusių genų. Čia skaičiuojamas tik lytinių ląstelių kombinacinis kintamumas dėl atsitiktinio chromosomų derinimosi.

Empiriniais (F_2 hibridų) tyrimais zigotų genotipų derinių skaičius toks:

- monohibridinio kryžminimo – 4
- dihibridinio – 16
- trihibridinio – 64
- polihibridinio – 4^n

Galimam zigotų genotipų skaičiui sužinoti reikia sudauginti tėvo ir motinos lytinių ląstelių derinių tikimybes:

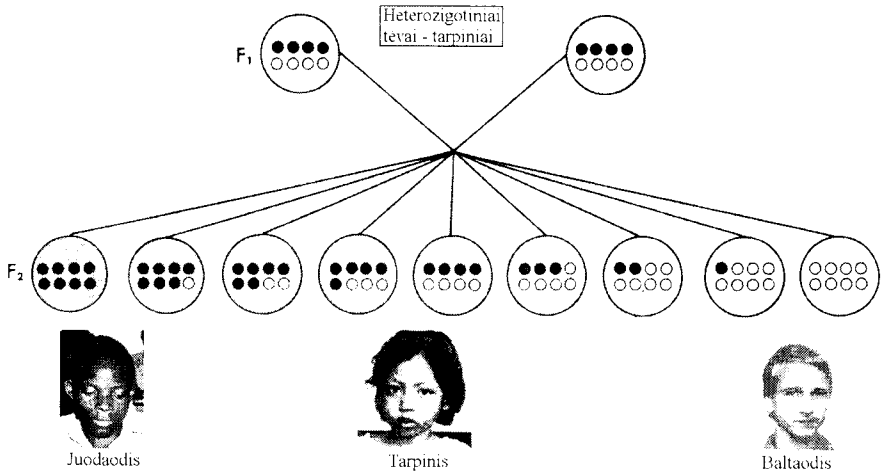
$$2^n \times 2^n$$

Žmogaus būtų iš tiesų astronominis skaičius: $2^{23} \times 2^{23} = 2^{46}$, arba $8{,}4 \cdot 10^6 \times 8{,}4 \cdot 10^6 = 7{,}056 \cdot 10^{13}$. Ir tai be krosingoverio.

Abi šios formulės įsimintinos. Jomis naudojamasi įvairiais tikslais. Pvz., norint nustatyti, keli genai lemia požymį. Sprendžiama pagal tai, iš kokio minimalaus F_2 hibridų skaičiaus išskilo vienas individas su recesyviuoju požymiu:

1 iš 4 – požymį lemia 1 genų pora,
1 iš 16 " 2 genų poros,
1 iš 64 " 3 genų poros,
1 iš 256 " 4 genų poros,
1 iš 1024 " 5 genų poros,
ir t. t.

Davenportas (C. Davenport, 1913 m.) vienas pirmųjų pritaikė šiuos skaičiavimus, norėdamas nustatyti, keli genai lemia juodaodžių ir baltaodžių žmonių kūno spalvos (melanino sintezės) skirtumus. Jis ištyrė mulatų (heterozigotų santuokų) palikuonis ir nustatė, kad kūno



9.10 pav. **Požymio paveldėjimas, kai poligenų porų nedaug:** pavyzdyje žmogaus kūno spalvą lemia keturios poligenų poros; tėvai heterozigotiniai (atitinka F_1), jų fenotipas tarpinis; F_2 – poligenų pasiskirstymas tarp jų palikuonių ir fenotipai

spalvos skirtumus lemia nors nevienodas, bet palyginti nedidelis nealelinių genų skaičius: 4–6 (9.10 pav.).

Daugelyje žmogaus veiklos sričių reikia atlikti polihibridinio kryžminimo analizę:

- **kiekybinių požymių genetikoje** (žmogaus kūno spalvos skirtumai priskiriami šiai požymių grupei);
- **gamtinėse populiacijose, žmonių šeimose** (tėvas nuo motinos skiriasi daugeliu genų);
- **selekcijoje** – dažniausiai ieškoma palankių genų derinių ne tarp 2–3, o 10 ir daugiau genų porų.

Fenotipų įvairovė paprastai yra mažesnė negu genotipų įvairovė. Maksimaliu atveju genotipų ir fenotipų įvairovė sutampa. Tuo galima buvo įsitikinti iš vienos chromosomų/genų poros rezultatų (žr. 9.1 lentelę).

Tačiau hibridų fenotipų įvairovė irgi susijusi su bendru chromosomų skaičiumi kariotipe ir genų padėtimi chromosomose. Genetinės

analizės rezultatai priklauso nuo to, kiek ištirta genų, kurie paveldimi nepriklausomi arba sukibę. Kai genai paveldimi nepriklausomi,

monohibridų (*Aa* × *Aa*) palikuonys (F_2) susiskaido į 2 fenotipines grupes santykiu **3:1**,
dihibridų (*Aa Bb* × *Aa Bb*) – į 4 fenotipines grupes santykiu **9:3:3:1**,
trihibridų (*Aa Bb Cc* × *Aa Bb Cc*) – į 8 fenotipines grupes santykiu **27:9:9:9:3:3:3:1**,
polihibridų – į 2^n fenotipines grupes santykiu $(3+1)^n$.

Nepriklausomas požymių paveldėjimas. Trūksta trečiojo Mendelio dėsnio, kurį galima aptikti ir įrodyti tik ištyrus dviejų ir daugiau genų, esančių nehomologinėse chromosomose, paveldėjimą.

Požymiai paveldimi nepriklausomai vieni nuo kitų, jeigu juos lemiantys genai yra nehomologinėse chromosomose.

Antroji šio dėsnio dalis atsirado jau po Mendelio. Dar kiek vėliau, po Morgano darbų, įsitikinta, kad „nepriklausomai" paveldimi ir tie genai, kurie yra toje pačioje chromosomoje, bet nutolę vienas nuo kito. Taip yra dėl krosingoverio.

Genetinė rekombinacija – antras reiškinys, kurį galima aptikti tik ištyrus daugiau kaip vienos genų poros paveldėjimą. Ir tai nepriklausomai nuo to, ar genotipų įvairovė atsiradusi

- dėl laisvo chromosomų derinimosi ar
- dėl krosingoverio.

Suminė skilimo F_2 formulė. Iš Peneto gardelės dihibridiniam kryžminimui (9.9 pav.) akivaizdu, kad kai yra visiškas dominavimas, konkrečioje genų poroje pakanka vieno dominuojančiojo alelio, kad fenotipe pasireikštų dominuojantis požymis. Fenotipas bus tas pats, ar būtų, pvz., homozigota *AA*, ar heterozigota *Aa*. Todėl labai patogu dihibridinio kryžminimo fenotipų santykį F_2 užrašyti šitaip:

$$9A - B - : 3A - bb : 3aa\ B - : 1aa\ bb$$

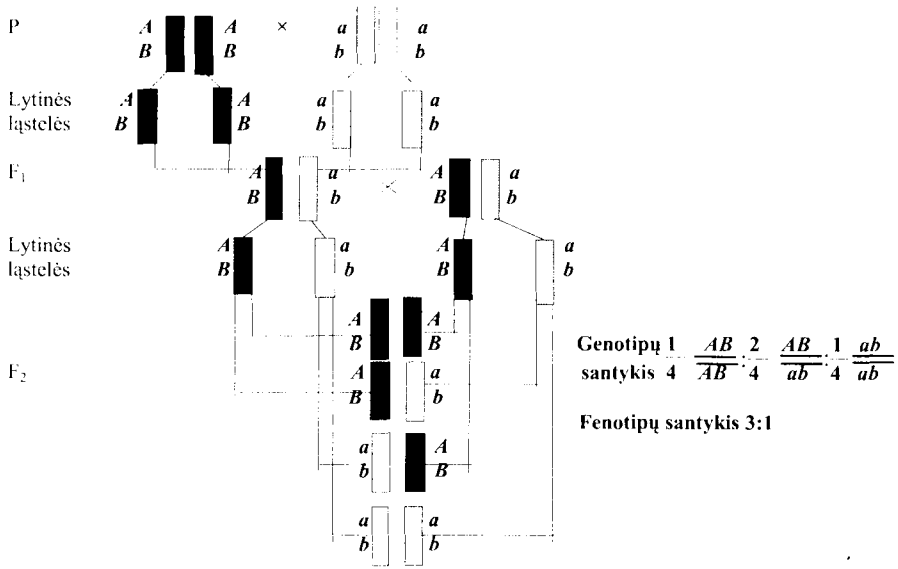
Čia ir kitur brūkšnys (–) reiškia antrąjį genų poros alelį, kuris nelemia fenotipo. Ši formulė parodo, iš kokių genotipų susidaro fenotipų grupės.

9.4.2. Paveldėjimas, kai genai yra vienoje chromosomoje. Genų sankiba

Genų sankibą pirmieji aptiko Beitsonas ir Penetas 1906 m. kaip išimtį iš Mendelio dėsnių, nesuprasdami reiškinio esmės. Jie pastebėjo, kad du pelėžirnių požymiai – žiedadulkių forma ir žiedo spalva – paveldimi priklausomai nuo vienas kito. Tačiau jie manė, kad šis reiškinys yra viena iš retų Mendelio dėsnio išimčių. Tik Morganas su bendradarbiais, tirdami drozofilą, pakartotinai atrado šį reiškinį, išaiškino jo esmę ir įrodė, kad genų sankiba yra ne išimtinis, o dėsningas reiškinys.

Genai, kurie yra vienoje chromosomoje, paveldimi sukibę (jeigu atstumas tarp šių genų nėra didelis).

Dihibridinis kryžminimas esant genų sankibai. Kai požymiai paveldimi nepriklausomai vienas nuo kito, F_1 dihibridai sudaro po 4 lytinių ląstelių tipus, ir F_2 palikuonys išsiskiria santykiu 9:3:3:3:1. Jeigu genai yra sukibę, dihibridinio kryžminimo santykis yra 3:1. Atsitinka taip:



Taigi esant sankibai F_1 dihibridas sudaro ne 4, o tik 2 gametų tipus, todėl ir F_2 yra tik 4 zigotų deriniai. Genotipų santykis yra 1:2:1, fenotipų – 3:1, kaip ir monohibridinio kryžminimo. Toks san-

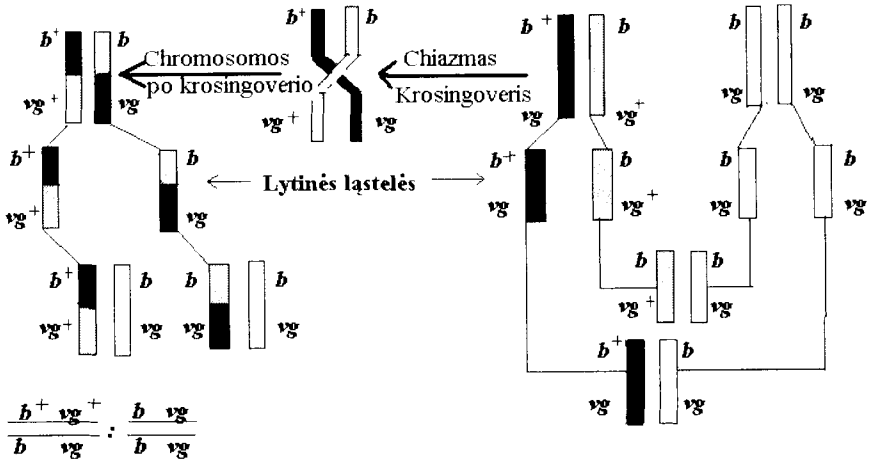
tykis būtų ir sukryžminus formas, besiskiriančias šimtais požymių, jeigu tik juos nulemiantys genai yra toje pačioje chromosomoje arti vienas kito.

Genų sankibos nustatymas. Visiška ir nevisiška sankiba. Vienas kryžminimų tipas tų aukštesniųjų eukariotų, su kuriais galima eksperimentuoti genetikoje, itin populiarus. Tai daug kartų jau minėti analizuojantieji kryžminimai.

> **Analizuojantysis kryžminimas** yra tada, kai tiriamasis individas, dažniausiai heterozigota, kryžminamas su recesyviuosius požymius turinčia homozigota, kad ir *Aa Bb*×*aa bb*. Tokiu būdu kokybiškai ir kiekybiškai analizuojami tiriamojo individo lytinių ląstelių genotipai.

Drozofilos analizuojančiųjų kryžminimų rezultatai priklauso nuo **hibrido lyties**. Kai analizuojančiuoju kryžminimu tiriami drozofilos vyriškos lyties hibridai, esant sukibusiems genams, visi palikuonys pasidalija į dvi grupes santykiu 1:1. Tai reiškia visišką sankibą, arba kitaip, kad šių hibridų mejozėje nevyko krosingoveris, buvo achiazminė mejozė.

Visiškai kitokie rezultatai gaunami, kai analizuojančiuoju kryžminimu tiriamas drozofilos hibridas yra patelė. Sukryžminus hibridinę patelę su recesyviuosius požymius turinčiu patinėliu, palikuonys susiskirsto į keturias grupes, bet netolygiai – po dvi, kurių tik viduje santykis atitiktų 1:1. Pasirinkto pavyzdžio tai atrodytų taip:



$$\frac{b^+\ vg^+}{b\ \ vg} : \frac{b\ \ vg}{b\ \ vg}$$

Galutinis rezultatas:

krosingoveris, nevisiška sankiba **be krosingoverio, visiška sankiba**

$$\frac{b^+\ vg^+}{b\ \ vg} : \frac{b\ \ vg}{b\ \ vg} \qquad \frac{b\ \ vg^+}{b\ \ vg} : \frac{b^+\ vg}{b\ \ vg}$$

1:1 **1:1**

Pasirinktame pavyzdyje abu sukibę genai *vg* (angl. *vestigial* – rudimentiniai sparnai) ir *b* (angl. *black* – juoda kūno spalva) yra antrojoje chromosomoje, taigi autosomoje, ir jeigu ne achiazminė mejozė vyriškosios lyties individų generatyvinėse ląstelėse, lyčių analizuojančiojo kryžminimo rezultatai nesiskirtų. Įdomiausia tai, kad šią nusistovėjusią tvarką galima pakeisti. Apšvitinus drozofilų patinėlius jonizuojančiaisiais spinduliais arba paveikus cheminiais mutagenais, patinėlių generatyvinėse ląstelėse taip pat vyksta krosingoveris.

Krosingoverį patinėlių ląstelėse sukelia judrieji drozofilos genomo elementai. Dėl šios priežasties jie vadinti MRF (angl. *male recombination factors*). Antai patinėlių ląstelėse rekombinacijos dažnis tarp genų *cn* ir *bw* yra tik 0,007%, o kai yra judrusis genomo elementas, pvz., P, krosingoverio dažnis lygus 0,84%. Padidėja 120 kartų.

Mejozinis krosingoveris slopinamas ir kitų *Diptera* patinėlių generatyvinėse ląstelėse. Tačiau mitozinis krosingoveris abiejose lytyse yra vienodo dažnio. Ir kai kurių kitų organizmų heterogametinėje lytyje (ši lytis turi skirtingas lytines chromosomas XY) mejozinis krosingoveris yra retesnis. Taip yra pelių, vištų, balandžių patinėlių ir netgi žmogaus vyriškosios lyties generatyvinėse ląstelėse. Tai irgi gali būti susiję su neįprasta X ir Y chromosomų sinapse mejozėje.

Genų sankibos grupių dėsnis. Tirdamas drozofilos genų sankibą, Morganas nustatė, kad

> genai/požymiai paveldimi grupėmis. Grupę sudaro genai, esantys toje pačioje chromosomoje, o grupių skaičius priklauso nuo chromosomų skaičiaus haploidiniame jų rinkinyje (n).

Drozofilos n = 4, todėl visi požymiai yra paveldimi keturiomis genų sankibos grupėmis, žmogaus n = 23, vadinasi, yra 23 genų sankibos grupės, tačiau nurodomos 24 ar net 25 genų sankibos gru-

38. 1313

pės. Kaip atskiros grupės nurodomi genai, esantys X ir Y chromosomose, atskira grupe nurodomi ir mitochondrijų genai. Arklinės askaridės, kurios n = 1, visi požymiai paveldimi viena grupe. Nepriklausomo požymių paveldėjimo apskritai nėra. Tas pat būdinga prokariotams (bakterijoms). Žinoma, tai priklauso ir nuo to, kaip vertinami plazmidžių genomai.

Ir vis dėlto gaunami nauji sukibusių genų deriniai, nes genų sankiba nėra absoliuti. Tai lemia krosingoveris.

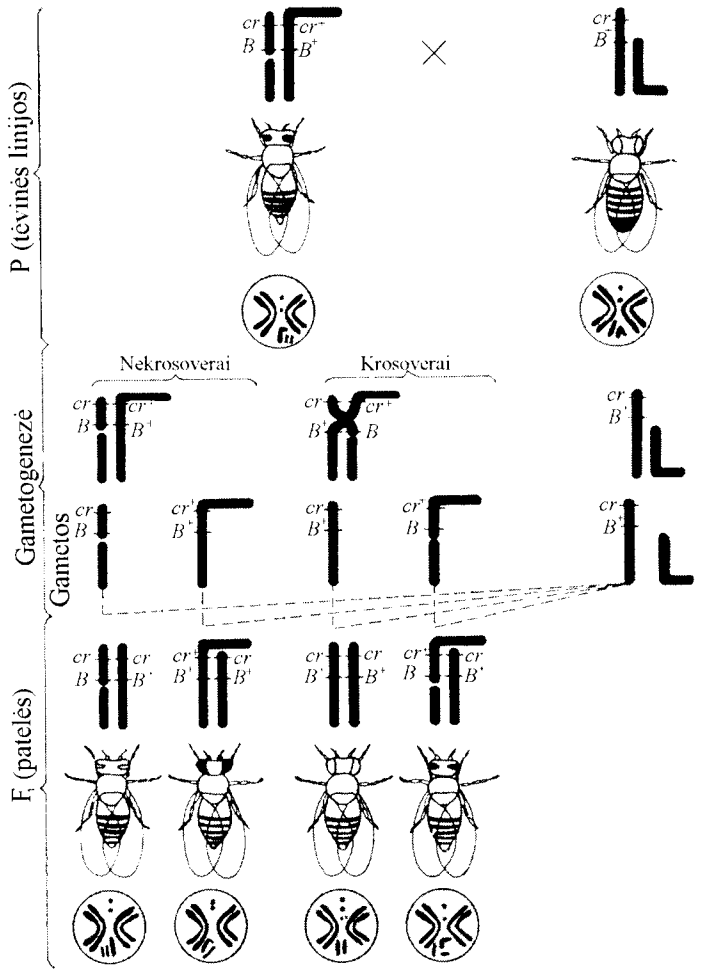
9.4.3. Krosingoveris

Krosingoverio įrodymas. Morganas krosingoverį įrodė analizuojančiaisiais kryžminimais, kaip ir genų sankibą (žr. aukščiau). Tik po 20 metų krosingoveris buvo įrodytas citogenetiškai. 1931 m. nepriklausomai vienas nuo kito tai atliko Šternas (C. Stern) su drozofila ir Maklintok bei Kreiton (H. B. Creighton) su kukurūzais. Atliekant abu bandymus, kryžmintos dvi linijos skirtingai citologiškai pažymėtomis chromosomomis. Homologinėms chromosomoms apsikeitus segmentais, abi citologinės žymės atsidūrė vienoje chromosomoje.

Šternas panaudojo dvi drozofilų linijas, kurios turėjo **ypatingos sandaros X chromosomas**. Vienos jų X chromosoma buvo kablio pavidalo su prisitvirtinusiu jos gale iš šono **Y** chromosomos segmentu. Kitos linijos X chromosoma buvo iš dviejų fragmentų. Mažesniajame jos fragmente buvo du mutantiniai genai: recesyvusis *cr* (angl. *carnation* – raudonasis gvazdikas) – gvazdikų spalvos akys ir dominuojantis *B* (angl. *bar* – juosta, lazdelė) – „susiaurėjusios akys“ (sumažėjęs akučių skaičius). Linijoje su kablio pavidalo X chromosoma buvo normalūs abiejų šių genų aleliai (cr^+ ir B^+).

Linijos su žymėtosiomis X chromosomomis buvo kryžmintos tarpusavyje, o jų F_1 patelės – su linija, turinčia recesyviuosius genus *cr* ir B^+ (9.11 pav.).

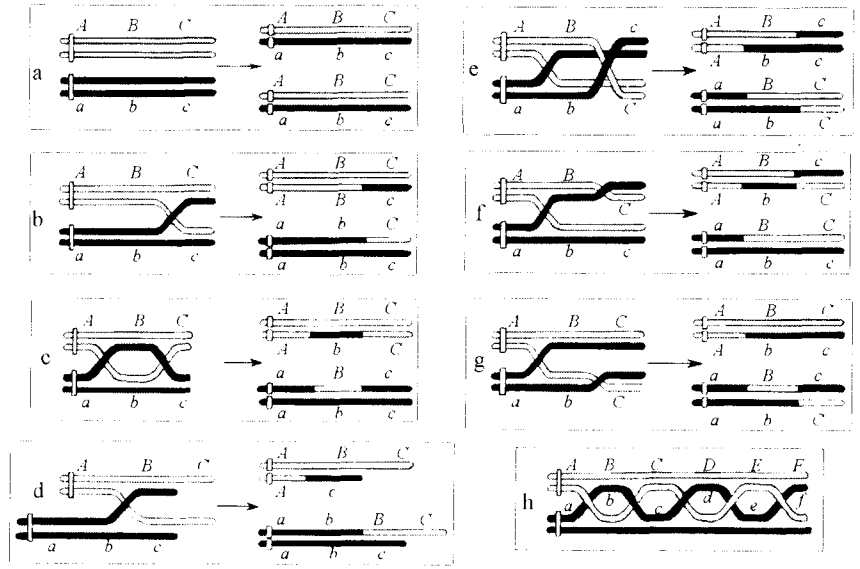
Toliau analizuotos tik patelės dėl dviejų priežasčių: jos turi 2X chromosomas ir tik moteriškoje drozofilos lytyje vyksta krosingoveris. Kaip ir tikėtasi, be patelių, kurios turėjo siauras gvazdikų spalvos akis (*crcr* BB^+) arba normalios spalvos ir formos akis (cr^+cr B^+B^+), atsirado dar dvi grupės: gvazdikų spalvos normalios formos akimis (*crcr* B^+B^+) ir normaliomis X chromosomomis arba normalios spalvos siauromis akimis (cr^+cr^+ BB^+) ir su abiem citologinėmis žymėmis



9.11 pav. **Citologinis krosingoverio įrodymas:**
cr^+ (*carnation*) – normalios tamsiai raudonos akys, dominuojantis genas; *cr* – gvazdikų spalvos akys, recesyvusis genas; *B* (*Bar*) – susiaurėjusios akys, dominuojantis genas; B^+ – normali akių forma, recesyvusis genas; po krosingoverio vienoje iš X chromosomų yra abi citologinės žymės, o antroji normali, be žymių

vienoje iš X chromosomų. Tokios chromosomos galėjo atsirasti tik dėl krosingoverio.

Krosingoverio tipai (9.12 pav.). Du svarbūs krosingoverio tipai – **mitozinis** (žr. p. 215) ir **netolygus** (žr. p. 138), jų atsiradimas ir pasekmės pakankamai smulkiai aptarti III skyriuje kaip somatinių



9.12 pav. **Krosingoverio tipai:**
a – krosingoveris neįvykęs; *b* – viengubas; *c* – dvigubas tarp dviejų chromatidžių; *d* – netolygus; *e* – dvigubas tarp keturių chromatidžių; *f*, *g* – dvigubas tarp trijų chromatidžių; *h* – daugybinis

ląstelių pertvarkos būdai. Būtina priminti, kad dėl netolygaus krosingoverio vienoje iš krosoverinių chromosomų atsiranda duplikacija (tai gali būti genų amplifikacijos būdas), o kitoje chromosomoje – delecija. Po mitozinio (arba somatinio) krosingoverio atsiranda somatinių ląstelių genotipų įvairovė; gali būti ir fenotipo pokyčių – mozaikų.

Priešingi šiems krosingoverio tipams yra mejozinis ir tolygus tipai. Abu šiuos tipus reikėtų laikyti pagrindiniais.

Mejozinis krosingoveris vyksta mejozės I profazėje, kai homologinės chromosomos jau yra iš keturių chromatidžių – sudaro bivalentą (žr. toliau). Susidaro lytinės ląstelės su naujai sukibusiais genais. Jos vadinamos **krosoverinėmis**, kaip ir homologinės chromosomos, tarp kurių apsikeista segmentais. Kai apsivaisinant dalyvauja krosoverinės lytinės ląstelės, naują sukibusių genų seką paveldi palikuonys.

Nors mejozinis krosingoveris statistiškai aprašomas kaip atsitiktinis reiškinys, bet jis dėsningas ir sąlygojamas homologinių chromosomų sinapsės, ypatingos mejozinės chromosomos sandaros ir specialių genų (žr. X skyrių).

Viengubas, dvigubas, daugybinis krosingoveris. Dvi homologinių chromosomų chromatidės gali keistis segmentais viename taške – **viengubas** krosingoveris, (9.12 pav., *b*), dviejuose taškuose – **dvigubas** krosingoveris (9.12 pav., *c* ir kt.) arba keliose vietose – **daugybinis** krosingoveris (9.12 pav., *h*). Tiksliai nustatant krosingoverio dažnį, labai svarbu atsižvelgti į dvigubo krosingoverio dažnį, nes, kaip pavaizduota 9.12 pav., *c*, šiuo atveju du galiniai taškai (genai) *A* ir *C* arba *a* ir *c* vienas kito atžvilgiu nekeičia padėties. Taigi dvigubų krosingoverių tarp šių genų neaptinkama. Skaičiuojant krosingoverio dažnį tarp dviejų genų, daroma pataisa – pridedami dvigubi krosingoveriai. Tačiau faktiškai dvigubas krosingoveris yra aiškiai retesnis negu turėtų būti teoriškai apskaičiavus.

Pavyzdys iš Morgano ir Startevanto darbo. Jie ištyrė krosingoverį tarp trijų drozofilos genų ***w*** (*white* – baltos akys), ***y*** (*yellow* – geltonas kūnas) ir ***m*** (*miniature* – maži sparnai), kurie yra X chromosomoje. Dvigubo krosingoverio tarp šių genų tikimybė turėtų būti lygi viengubų krosingoverių tikimybių sandaugai. Konkrečiai šiems genams būtų 0,43. Iš tikrųjų dvigubo krosingoverio dažnis buvo tik 0,045, t. y. beveik 10 kartų mažesnis.

Krosingoveris vienoje chromosomos vietoje slopina krosingoverį kitoje tos pačios chromosomos vietoje. Šis reiškinys vadinamas **interferencija**.

Ji pasireiškia tik tada, kai atstumas chromosomoje ne didesnis kaip 10% (cM) krosingoverio vienetų. Kai atstumas didesnis kaip 35%, šis reiškinys visiškai išnyksta.

Nepriklausomas paveldėjimas, kai atstumas tarp genų didelis. Kai genai yra nutolę, krosingoveris toks dažnas, kad keturių genotipų lytinių ląstelių ir atitinkamai palikuonių po analizuojančiojo kryžminimo yra maždaug po lygiai:

$$\frac{AB}{ab} : \frac{ab}{ab} \quad : \quad \frac{Ab}{ab} : \frac{aB}{ab}$$

(be krosingoverio) (po krosingoverio)

Todėl ir toje pačioje chromosomoje esantys genai paveldimi nepriklausomai, lyg jie būtų nehomologinėse chromosomose.

Pasitaiko kuriozų. Vienas jų – net 7 žirnių požymiai, kuriuos tyrė Mendelis, yra sukibę, t. y. juos lemiantys genai yra toje pačioje chromosomoje, tik dideliu atstumu vienas nuo kito. Antai atstumas tarp genų, lemiančių sėklos luobelės ir pačios sėklos (sėklaskilčių) spalvą, yra 200%. Mendelio bandymuose sukryžminus

$$\frac{AI}{AI} \times \frac{ai}{ai};$$

čia *A* – pilkai ruda luobelė, *a* – balta luobelė, *I* – geltona sėklų spalva, *i* – žalia sėklų spalva, F_2 santykis atitiko 9:3:3:1 ($\chi^2 = 2{,}26$, $P > 0{,}05$):

357 *A– I–* : 132 *A– ii* : 116 *aa I–* : 34*aa ii*

Vadinasi, šių sukibusių genų paveldėjimas visiškai atitinka nepriklausomo požymių paveldėjimo dėsnį.

Krosingoverio priklausomybė nuo įvairių veiksnių. Krosingoverio dažnis tarp bet kurių dviejų genų yra santykinai pastovus dydis, ir pagal tai nustatomas atstumas tarp genų. Krosingoveris yra genetiškai užprogramuotas reiškinys, todėl yra genai, kurių produktai atlieka genetinę rekombinaciją. Aptiktos šių genų mutacijos. Genotipo svarba ypač išryškėja, kai dėl mutacijos slopinama kuri nors krosingoverio grandis, pvz., paveldimai sutrinka homologinių chromosomų sinapsė. Drozofilos III chromosomoje yra genas, kurio mutacija slopina krosingoverį visose chromosomose.

Didelę įtaką krosingoveriui turi chromosomų sandaros ypatumai: atstumas nuo centromeros, chromosomos kondensacija (euchromatinas ar heterochromatinas), chromosomų sandaros pokyčiai. Centromera krosingoverį slopina: tarp dviejų genų, kurie yra arti centromeros, krosingoverio dažnis yra mažesnis negu tarp dviejų genų, esančių tokiu pačiu atstumu vienas nuo kito, tik nutolusių nuo centromeros. Dėl kai kurių chromosomų mutacijų, ypač inversijų, kai chromosomos segmentas pasisuka 180°, krosingoveris vyksta, bet nepasireiškia, nes susidaro negyvybingos, genetiškai nesubalansuotos lytinės ląstelės. Jos žūva, todėl nepavyksta gauti krosoverinių individų.

Krosingoverio dažniui turi įtakos organizmų fiziologinė būklė – amžius, lytis. Jaunų ir senų drozofilos patelių krosingoveris dažnesnis, vidutinio amžiaus – retesnis.

Aplinkos veiksniai irgi gali keisti krosingoverio dažnį. Jau minėta, kad, apšvitinus drozofilų patinėlius jonizuojančiaisiais spinduliais, jų generatyvinėse ląstelėse pastebimas krosingoveris, kuris paprastai patinėliuose nevyksta. Patelių chromosomose dėl jonizuojančiosios spinduliuotės padažnėja krosingoveris. Be to, 17–29°C temperatūroje drozofilų krosingoveris yra santykinai pastovus, bet temperatūrai pakilus arba pažemėjus jis padažnėja. Krosingoveris taip pat labai priklauso nuo kai kurių dvivalenčių ir trivalenčių metalų jonų, ypač nuo kalcio

koncentracijos. Sumažėjus kalcio jonų koncentracijai arba paveikus drozofilą EDTA (etilendinitrilotetraacetatu), kuris suriša dvivalenčių ir trivalenčių metalų jonus, krosingoveris labai padažnėja. Būdinga tai, kad aplinkos veiksniai nevienodai keičia krosingoverio dažnį įvairiose chromosomos dalyse. Ypač jis padažnėja arti centromeros.

9.4.4. Netipiškas eukariotų požymių paveldėjimas

Kartais netipiškas paveldėjimo pobūdis pasireiškia jau heterozigotose arba atliekant hibridologinę analizę pirmojoje hibridų kartoje (F_1). Pavyzdžiui, matoma F_1 palikuonių įvairovė arba neįprasti, netikėti F_1 hibridų fenotipai, nors abu tėvai yra homozigotiniai. Tačiau paprastai apie nukrypimą nuo tipiško požymio/geno paveldėjimo sprendžiama iš F_2 (arba šią kartą atitinkančių palikuonių – abu tėvai heterozigotiniai) tyrimų.

Dar Mendelis nustatė, kad **F_2 palikuonys susiskaido į grupes tam tikrais santykiais** (tai jo 2-asis dėsnis). Taigi iš anksto galima numatyti, į kokias genotipų ir fenotipų grupes ir kokiais jų santykiais turėtų susiskaidyti F_2 hibridai.

Matematinis nukrypimų įvertinimas. Ar nukrypimas yra dėsningas reiškinys, ar atvirkščiai, nustatoma matematikos metodais. Štai kodėl genetikoje nuo šio mokslo atsiradimo pradžios labai plačiai taikomi ir vertinami matematikos metodai.

Pats paprasčiausias jų yra **χ^2 (chi) kvadrato metodas**. Juo patikrinama, ar nukrypimas nuo teoriškai laukiamo rezultato yra atsitiktinis:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

čia $\left(\frac{O-E}{E}\right)^2$ – konkrečios klasės (fenotipų grupės ir kt.) kvadratinis nukrypimas; Σ – visų kvadratinių nukrypimų suma; O – konkrečios klasės (grupės) rezultatas; E – rezultatas, kurio tikimasi iš šios klasės (grupės).

Naudojamasi ir kitais matematikos metodais (Kolmogorovo), kai norima įvertinti, ar nukrypimas atsitiktinis, ar dėsningas.

Genetikos dėsniai yra statistikos dėsniai. Tai taikytina visiems genetikos reiškiniams, kurie išreiškiami santykiais ar genotipų/fenotipų dažniais, tarp jų ir F_2 santykiais esant visiškam dominavimui ir

nepriklausomam genų/požymių paveldėjimui – dviem reiškiniams, kuriuos nustatė ir tyrė Mendelis.

Kad palikuonių susiskaidymo į grupes santykiai yra statistikos dėsniai, nesunku įsitikinti. Pavyzdžiui, E. Gimbutienė 1939 m. aprašė tokį bandymą, kurį atlikdavo Dotnuvos žemės ūkio akademijos studentai. Didelei studentų grupei buvo išdalytos po lygiai dviejų veislių pupelių sėklos, kurios buvo vienodos formos, bet skirtingos spalvos, tarkime, juodos ir baltos. Studentai užsirišdavo akis, pupelių sėklas sumaišydavo, išdėliodavo po dvi ir atsirišdavo akis. Sususmavus visų studentų stebėjimų duomenis, gautas apytikriai toks sėklų porų santykis: 1/4 juoda juoda : 2/4 juoda balta : 1/4 balta balta. Kitose šalyse genetikos pratybos prasidėdavo monetos mėtymu: „herbas–skaičius". Kadangi pinigo pusė su herbu iškilesnė, tai susumavus daug metimų dažnesnė pusė buvo „skaičius". Jis „dominuodavo" santykiu 3:1.

Kai genai paveldimi nepriklausomai ir tarp alelių heterozigotose pasireiškia visiškas dominavimas, tipiškas fenotipų santykis F_2 yra

- monohibridinio kryžminimo – 3:1
- dihibridinio – 9:3:3:1
- trihibridinio – 27:9:9:9:3:3:3:1
- polihibridinio – $(3+1)^n$.

Būtina įsidėmėti du svarbius genetinės analizės dalykus.

Pirma, skilimo santykiams, kaip statistikos dėsniams, būdinga tai, kad konkretaus tyrimo rezultatas nevisiškai sutampa su teoriniais skilimo santykiais, tik daugiau ar mažiau priartėja prie jų. Taip buvo ir Mendelio bandymuose. Nagrinėto dihibridinio kryžminimo atveju tikrasis fenotipų santykis F_2 buvo ne 9:3:3:1, o 9,8 geltonų lygių : 3,1 geltonų raukšlėtų : 3,4 žalių lygių : 1 žalių raukšlėtų.

Kiek bus priartėta prie teorinio santykio, priklausys nuo ištirtų palikuonių skaičiaus. „Idealūs" sutapimai gali būti tik mokslininko nesąžiningumo įrodymas.

Antra, neteisinga būtų ieškoti statistinio dėsnio pasireiškimo pavienėse žmonių šeimose, net ir gausiose. Jose individų skaičius nepakankamas statistiniam dėsniui pasireikšti. Kai F_2 palikuonių skaičius ribotas, kartais net santykius 2:1 ar 6:1 tenka pripažinti kaip 3:1. Net gana gausios žirnių šeimos (vieno augalo palikuonys) buvo nepakankamos minėtiems santykiams nustatyti.

Bet kaip ir metant monetą (iškilesnė pusė) ar skaičiuojant pupeles (lygus juodų-baltų sėklų skaičius), yra sąlygos, kurios būtinos, kad F_2 palikuonys susiskirstytų į fenotipines (ir atitinkamas genotipines) grupes santykiais 3:1, 9:3:3:1 ar 27:9:9:9:3:3:3:1.

Sąlygos tipiškiems fenotipų santykiams F_2 pasireikšti, esant nepriklausomam genų paveldėjimui ar visiškam dominavimui, yra tokios:

- pakankamai ištirta palikuonių;
- genai susidarant lytinėms ląstelėms turi derintis atsitiktinai, nepriklausomai;
- lytinės ląstelės turi būti genetiškai grynos, t. y. haploidinės, ir visų genotipų lytinių ląstelių turi susidaryti po lygiai ir būti vienodai gyvybingos;
- apvaisinimas turi būti atsitiktinis ir tipiškas;
- visų genotipų zigotos turi būti vienodai gyvybingos;
- tarp nealelinių genų (esant dihibridiniam ir sudėtingesniems kryžminimams) neturi būti sąveikos.

Lytinių ląstelių genotipų nukrypimai. Susidarant lytinėms ląstelėms, genai gali pasiskirstyti neatsitiktinai, esant genų sankibai, kai nealeliniai genai yra toje pačioje chromosomoje. Tokiu atveju ir tarp nealelinių genų gaunamas santykis 3:1. Lytinės ląstelės yra genetiškai negrynos esant poliploidijai, kai ląstelėje yra po 3–4 ir daugiau chromosomų rinkinių, arba aneuploidijai, kai padidėja pavienių chromosomų skaičius, yra 3 ir daugiau homologinių chromosomų. Lytinės ląstelės šiais atvejais gali būti net heterozigotinės, būtent *Aa* arba *Aa Bb* ir kt. Dėl įvairių priežasčių (skirtingų genotipų gametų nevienodo jautrumo nepalankiems veiksniams, virusinei infekcijai, nevienodo gyvybingumo) hibriduose (heterozigotose) skirtingų genotipų lytinės ląstelės gali būti nevienodu santykiu. Atskiri genotipai gali visiškai išnykti (kai veikia letalūs genai) arba iš dalies išnykti (kai genotipe yra subletalūs genai).

Mejozės slinkis (angl. *meiotic drive*). Paprastai mejozėje heterozigotinio individo (*Aa*) pusė ląstelių yra su aleliu *A*, o kita pusė su aleliu *a*, nes homologinės chromosomos mejozėje paskirstomos tolygiai. Tačiau nustatytas reiškinys, kai ši taisyklė pažeidžiama ir kurio nors genotipo lytinių ląstelių susidaro perteklius.

Nors šis reiškinys yra atrastas seniai, dar 1957 m., Sandlerio (L. Sandler) ir Novickio (E. Novitzky), juo pradžioje susidomėjo tik evoliucionistai. Pastaruoju metu jis labai domina mejozės tyrinėtojus. Biologiškai „mejozės varžybos", mejozės slinkis svarbus kaip mikroevoliucijos veiksnys ir kaip vienas iš būdų heterozigotiškumui išsaugoti.

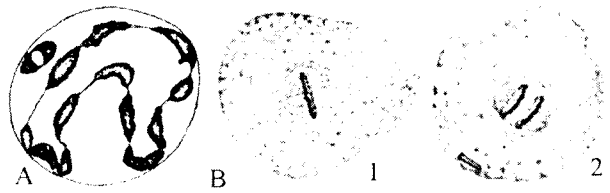
Dažniausiai kaip modelinis reiškinys mejozės slinkiui įrodyti tiriamos inversijos. Mejozės slinkio pavyzdžiu gali būti minėtasis pelių *t* lokusas (arba *t* haplotipas). Tai chromosomos segmentas, kuriame įvykusios net keturios inversijos. Susidaro 99% heterozigotų t/+ vietoj 50%. Sibire aptikta kitokių pelių inversijų, kurių dažnis pelių populiacijose 65–85%. Drozofilos mejozės slinkis lemiamas genų, pvz., *Segregation Distorter (SD)* lokuso.

Slinkis nesusijęs su dalies lytinių ląstelių arba zigotų žūtimi, bet iš anksto programuota lytinių ląstelių žūtis yra aptikta įvairiuose organizmuose. Tai irgi būdas heterozigotiškumui išsaugoti.

Heterozigotiniai chromosomų kompleksai. Nakvišų, bijūnų, durnaropių, katilėlių ir kitų augalų, taip pat gyvūnų, ypač skorpionų ir žiogų, požymiai gali būti paveldimi tam tikru būdu susidarant heterozigotiniams chromosomų kompleksams.

Antai kiekviena nakvišos rūšis turi po du chromosomų komplekssus. Komplekso genai paveldimi kartu. Lietuvoje paplitusios dvimetės nakvišos (*Oenothera biennis*) ląstelėse vienas iš kompleksų pavadintas *albicans*, kitas – *rubens*. Nė vienas šios rūšies augalas negali iš karto turėti dviejų tokių pačių kompleksų – *rubens* arba *albicans*. Nors vyriškosios mikrosporos susidaro dviejų tipų – vienos su *albicans* kompleksu, o kitos – su *rubens*, tačiau normaliai funkcionuoja tik *rubens* kompleksą turinčios žiedadulkės. Megasporose, atvirkščiai, normaliai funkcionuoja tik *albicans* kompleksas. Vadinasi, visi palikuonys iš tėvo paveldi *rubens*, o iš motinos – *albicans* kompleksus.

Visas kompleksas atitinka vieną bendrą chromosomų žiedą (9.13 pav.). Kompleksai sudėtingu būdu išsivystė tada, kai visose be išimties nakvišos chromosomose įvyko translokacijos: buvo apsikeista segmentais tarp nehomologinių chromosomų. **Mejozėje vienas žiedas keliauja į vieną polių, kitas – į kitą.** Taip nakvišos chromosomos paveldimos ištisais kompleksais. Kad homologinės chromosomos nekonjuguotų, be translokacijų, kiekvienoje homologinėje chromosomoje dar yra segmentų, kurių nėra kitoje homologinėje chromosomoje. Tai diferenciniai segmentai. Pagaliau chromosomų kompleksų veikla labai sudėtingai suderinta. Ji reguliuojama taip, kad *albicans* vyriškos lytinės ląstelės ir *rubens* moteriškos lytinės ląstelės būtų negyvybingos.



9.13 pav. **Chromosomų kompleksai:**
A – nakvišos (*Oenothera*), matyti žiedas iš 12 chromosomų ir atskirai vienas bivalentas;
B – *Amoeba glebae* metafazėje (*1*) ir anafazėje (*2*)

Kaip valdoma lytinių ląstelių su vienu ar kitu kompleksu žūtis, kol kas neištirta.

Dėl heterozigotinių chromosomų kompleksų visi palikuonys yra heterozigotiniai ne pagal atskirus genus, o pagal visą genomą.

Neatsitiktinis apvaisinimas. Nukrypimai nuo tipiško lytinio dauginimosi, susiliejant tėvinėms ir motininėms lytinėms ląstelėms, taip pat būna viena iš pakitusių skilimo santykių priežasčių. Augalams dauginantis apomiksės (apeinant autbrydingą, be lytinių ląstelių susiliejimo, iš moteriško gametofito) būdu, F_1 hibridų palikuonys visiškai neskyla į grupes. Tokius duomenis gavo ir Mendelis, kryžmindamas vanagės (*Hieracium*) rūšis tarpusavyje. Kai organizmai dauginasi partenogenezės – ginogenezės ir androgenezės būdu, vietoj dviejų lyčių išsivysto tik viena. Ir šiais būdais besidauginančių organizmų palikuonys gali nesiskaidyti į grupes, be to, turi tik atitinkamai motinos ar tėvo požymius.

Selektyvusis apsivaisinimas – neatsitiktinis gametų susiliejimas. Pasirinktinai apsivaisinama tam tikrų genotipų vyriškomis gametomis, todėl atsiranda esminiai nukrypimai nuo laukiamo genetinės analizės rezultato. Pavyzdžiu gali būti žmogaus lyčių santykis.

Selektyvusis apsivasinimas ir lyčių santykis. Šis santykis, atsitiktinai susiliejus lytinėms ląstelėms, turėtų būti 1:1 (žr. p. 382), tačiau berniukų gimsta apie 5,6% daugiau negu mergaičių. Mat spermatozoidai su Y chromosoma, lemiančia vyriškąją lytį, yra gerokai judresni ir dažniau apvaisina kiaušialąstes negu spermatozoidai su X chromosoma. Tik vyriškoji lytis ne tokia gyvybinga.

Selektyviuoju apvaisinimu galima paaiškinti, kodėl kinta lyčių santykis kintant aplinkos sąlygoms. Pavyzdžiui, auginant drozofilas nepalankiomis sąlygomis, padaugėja patinėlių. Geromis sąlygomis, atvirkščiai, būna daugiau patelių. Tai svarbu rūšies individų skaičiaus dinamikai: sumažėjus patelių, automatiškai sumažėja rūšies individų. Pastebėta, kad ir žmogaus lyčių santykis kinta priklausomai nuo aplinkos sąlygų: sunkiomis karo metų sąlygomis berniukų gimsta daugiau negu paprastai.

Kaip valdyti žinduolių, tarp jų žmogaus lytį, dabar realiai sprendžiama. Vienas iš būdų – pasinaudoti skirtumais tarp spermatozoidų su X ir Y chromosomomis. Šis būdas pamatuotas selektyviuoju apsivaisinimu ir gali būti taikomas visiems organizmams, kurie turi lytines chromosomas, net augalams. Pirmoji tokį būdą pasiūlė rusų mokslininkė V. Šreder dar 1934 m., būtent frakcionuoti žinduolių spermą elektriniame lauke. Šiuo metu spermatozoidų elektroforezės sąlygos tobulesnės, pavyksta gauti 90–95% grynumo spermatozoidų frakcijas. Grynos spermatozoidų frakcijos gaunamos remiantis skirtinga spermatozoidų lyginamąja mase (Y chromosoma smulki, o X chromosoma yra stambi, todėl spermatozoidai nevienodos masės), reakcija į skirtingą pH ir kt.

Valdyti lytį ypač svarbu, kai žemės ūkio produkcija gaunama tik iš vienos lyties individų (iš karvių pienas, iš vištų kiaušiniai ir pan.).

Zigotų išgyvenimas. Skirtingų genotipų zigotos nevienodai gyvybingos, dėl to gali iš esmės pakisti skilimo santykiai. Pavyzdžiui, žmonių vyriškoji lytis ne tokia gyvybinga kaip moteriškoji. To priežastys įvairios, ne tik biologinės, bet ir socialinės, nors berniukų, kaip minėta, gimsta 5–6% daugiau negu mergaičių (įvairiose populiacijose šis procentas svyruoja tarp 4 ir 11, o Indijoje mergaičių gimsta daugiau negu berniukų), vyresnėse amžiaus grupėse lyčių santykis iš esmės pakinta: 50 metų amžiaus grupėje 100 moterų tenka 85 vyrai, o 85 metų amžiaus grupėje 100 moterų – 50 vyrų.

Vaizdžiai skilimo santykio kitimą ontogenezėje iliustruoja paveldimas žmogaus defektas **siklemija**. Apie siklemiją, kurią sąlygoja hemoglobino β polipeptido geno mutacija, rašyta daug kartų ir dar bus rašoma. Kai tuokiasi du heterozigotiniai asmenys

$$Hb^AHb^S \times Hb^AHb^S,$$

tarp palikuonių stokojama homozigotinių Hb^SHb^S individų. Pasak Mendelio, jų turėtų būti ¼, ir palikuonių genotipų santykis turėtų būti toks:

$$1\ Hb^AHb^A : 2\ Hb^AHb^S : 1\ Hb^SHb^S,$$

tačiau iš tikrųjų jau gimsta tik apie pusę laukiamų homozigotų Hb^SHb^S, o apie 0,55 (nuo 1,00) žūva dar negimę. Homozigotiniai

Hb^SHb^S vaikai miršta sulaukę vos 3 mėnesių – 2 metų, todėl šios genotipų/fenotipų grupės visiškai nelieka, ir genotipų santykis toks:

$$1\ Hb^AHb^A : 2\ Hb^AHb^S.$$

Panašiai paveldimi ir kiti genai, kurie homozigotinėje būklėje yra letalūs: platininės lapių spalvos, pilkos (vadinama širazi) karakulinių avių spalvos ir kt. Kai kuriuos genotipus selektyviai veikia kiti genetiniai veiksniai, pvz., drozofilos SR veiksnys. Jis selektyviai žudo zigotas, paveldėjusias Y chromosomą. Todėl citoplazmoje SR veiksnį turinčiose drozofilos linijose yra vien tik patelės XX.

Įvairių genotipų zigotos, gemalai ir subrendę individai yra nevienodai atsparūs nepalankiems aplinkos veiksniams ir infekcinėms ligoms. Vėl gali vykti genotipų atranka, dėl kurios kai kurie genotipai iš dalies ar visiškai išnyksta.

Genų sąveika yra toks pat dėsningas, normalus eukariotų genetikos reiškinys, kaip ir nepriklausomas genų paveldėjimas ar sankiba, bet laikant tipiškais genų požymių susiskaidymo į grupes F_2 santykius 3:1, 9:3:3:1, 27:9:9:9:3:3:3:1, genų sąveika yra dažna priežastis, kodėl tie santykiai būna įvairūs.

9.5. Genų sąveika

9.5.1. Alelinių genų sąveika

9.5.1.1. Alelinių genų sąveikos tipai ir priklausomybė nuo įvairių veiksnių

Diploidinio organizmo branduolyje yra du haploidiniai chromosomų rinkiniai, todėl tik eukariotams būdingas heterozigotiškumas ir alelinių genų sąveika. Tipišku atveju **branduolio genome,** homologinėse chromosomose, vienu metu gali būti tik du aleliai:

- **tapatūs** – homozigotos,
- **skirtingi** – heterozigotos.

Dėl **kartotinių genų ir įvairių genomo pokyčių** – chromosomų mutacijų ir netolygaus krosingoverio, dėl kurių atsiranda duplikacijos, genų amplifikacija, tas pats genas ir jo aleliai gali būti pakartoti

daug kartų arba vienu metu genome gali būti daug to paties geno alelinių variantų. Taip, pvz., yra genų, koduojančių imunoglobulinų variabilųjį domeną, kur kiekvienas V genas yra skirtingas to paties geno alelis. Tačiau ir šiuo atveju tame pačiame homologinių chromosomų lokuse gali būti tik du tapatūs ar skirtingi aleliai.

Atrastos naujos alelinių genų sąveikos apraiškos, kurios netelpa į paprasto mendelizmo rėmus:

- **genomo imprintingas**, kai alelio veikla priklauso nuo to, iš ko – iš tėvo ar motinos – alelis yra paveldėtas. Dėl šio reiškinio skiriami dviejų tipų genai: bialelinės ir monoalelinės raiškos;
- **transvekcija**, kai vienas alelis keičia kitoje homologinėje chromosomoje esančio alelio veiklą tik tada, kai dvi homologinės chromosomos yra konjugavusios,
- **netipiškas mikrosatelitų paveldėjimas**.

Gilinantis į genų sąveikos priežastis, gali būti atrasta naujų genų sąveikos reiškinių.

Klasikiniu atveju skiriami keturi alelinių genų sąveikos tipai: visiškas dominavimas, nevisiškas dominavimas, kodominavimas ir superdominavimas.

Daugeliu atvejų normalusis (laukinis) alelis yra dominuojantis. Tai pirmasis nustatė Beitsonas, o Fišeris (R. A. Fischer, 1931) sukūrė teoriją, pagal kurią alelių santykiai – tai evoliucijos rezultatas. Toji teorija paaiškina, kodėl dauguma normalaus tipo požymių yra dominuojantys. Šį evoliucijos reiškinį jis pavadino **dominavimo evoliucija.**

Naujai atsiradę aleliai evoliuciniu atžvilgiu labai įvairūs. Gali būti mutacijos, kurios iš karto bus palaikytos atrankos, ir alelis ims vyrauti, pavyzdžiui, aleliai, lemiantys didesnį atsparumą nepalankiems veiksniams. Tačiau dažniausiai homozigotinėje, o neretai ir heterozigotinėje būklėje (jeigu mutacija yra dominuojanti) mutantiniai aleliai mažina gyvybingumą. Jeigu mutacija turi ne tik trūkumų, bet ir privalumų, kuriuos palaiko atranka, atrenkami tokie genai modifikatoriai (žr. toliau), kurie slopina neigiamas mutantinio geno savybes ir recesyvųjį geną paverčia dominuojančiu.

Taigi pagal šią teoriją normalusis tipas – ilgalaikės evoliucijos rezultatas, o dominavimas priklauso ne nuo atskirų genų, o nuo atitinkamų alelių veikimo bendroje genotipo sistemoje. Tai tik iš dalies teisinga, nes santykį tarp alelių lemia individualios geno ypatybės. Be to, yra nemažai dominuojančių negatyvių mutacijų. Paprastai jas atranka gana greit pašalins, bet mutantinis genas, tik ką atsiradęs, jau yra dominuojantis.

Visiškas dominavimas (9.1 lentelė, *A*) yra tada, kai heterozigotų (*Aa*) fenotipas nesiskiria nuo homozigotų su dominuojančiais genais (*AA*) fenotipo. Tas pats alelis (pvz., mėlyna akių spalva) vienoje alelių poroje yra recesyvusis, o kitoje – dominuojantysis. Net toks palyginti paprastas požymis kaip akių spalva gali būti pavyzdys:

rudą spalvą lemiantis alelis → dominuoja → mėlyną spalvą lemiantis alelis → dominuoja → raudoną spalvą lemiantis alelis

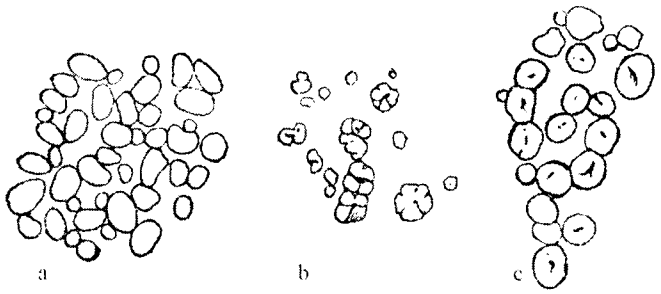
Nevisiškas dominavimas (9.1 lentelė, *B*) anksčiau apskritai buvo tapatinamas su hibrido, kaip kažko tarpinio tarp tėvų, sąvoka. Šiuo metu vieni hibridu laiko tik heterozigotas, kiti – visus dirbtinai sukryžmintų genetinių linijų, veislių F_1, F_2, F_3 ir kt. palikuonis.

Nevisiško dominavimo atveju heterozigotiniai individai yra tarpinio tarp abiejų homozigotų fenotipo, todėl heterozigotas galima skirti nuo homozigotų pagal fenotipą.

Šia savybe naudojamasi įvairiais tikslais:

- **genetinėje analizėje** (pvz., analizuojančiuose kryžminimuose), kai patikimai reikalingi heterozigotiniai individai;
- **selekcijoje** tiesiogiai panaudojami tarpiniai fenotipai – augalų selekcijoje heterozigotiniai augalai dauginami vegetatyviškai, o gyvulių selekcijoje tenka nuolat kryžminti tam tikras veisles ar linijas, pvz., kailinėje žvėrininkystėje taip veisiamos kai kurios audinės, karakulinės avys, platininės lapės;
- **žmogaus ir medicininėje genetikoje** atpažinti heterozigotiniams asmenims, turintiems genotipe žalingų recesyviųjų genų. Pvz., taip nustatomi asmenys, heterozigotiniai pagal fenilketonurijos, amaurozinės idiotijos ir kt. genus.

Dažniausiai tai taikoma recesyviesiems genams, kurių normalų fenotipą lemiantis alelis laikomas visiškai dominuojančiu. Ieškoma



9.14 pav. **Žirnių sėklų krakmolo grūdeliai:**
a – apvalių sėklų, *b* – raukšlėtų, *c* – F_1 hibrido, kurio sėklos išoriškai apvalios – pasireiškia visiškas dominavimas

kad ir nedidelių fenotipo skirtumų tarp normalių homozigotų (*AA* tipo) ir normalių heterozigotų (*Aa* tipo). Pasirodo, tokius skirtumus galima nustatyti net Mendelio žirniams. Visiškai dominuojantis požymis yra lygi žirnių sėklų forma, o raukšlėta sėklų forma – recesyvusis. Tačiau lygiasėklės homozigotos (*AA*) skiriasi nuo lygiasėklių heterozigotų (*Aa*) krakmolo grūdelių forma (9.14 pav.). Heterozigotinių pagal amaurozinės idiotijos geną asmenų ląstelėse padidėjusi vakuolizacija, nes šiek tiek sutrikusi lipidų apykaita.

Paveldimos metabolizmo ligos dažnai yra dėl to, kad nevyksta kurio nors fermento sintezė. Dažniausiai jos yra recesyviosios, nes pakanka vieno aktyvaus geno heterozigotose, kad biocheminių reakcijų eiga būtų normali ir asmuo sveikas. Tačiau

> heterozigotinių normalių asmenų ląstelėse bendras fermento aktyvumas dvigubai mažesnis negu normalių homozogotinių asmenų. Pasireiškia **geno dozės efektas**.

Naudojantis šia taisykle, pagal fermento aktyvumą išaiškinami heterozigotiniai asmenys, pvz., pagal fenilketonurijos, galaktozemijos ir kitų recesyviųjų metabolizmo ligų genus.

Šiuo metu heterozigotiškumas nustatomas molekulinės genetikos (molekulinių zondų) metodais. Homozigotinių ir heterozigotinių asmenų fenotipiniai skirtumai tiesiogiai svarbūs medicinoje, nes heterozigotiniai asmenys, nors ir normos ribose, atsilieka nuo homozigotinių asmenų, ir tai gali būti polinkio sirgti infekcinėmis ligomis, silpnesnių protinių sugebėjimų ir kt. priežastis.

> **Kodominavimas** (9.1 lentelė) – tai tas atvejis, kai sąveikos tarp dominuojančių genų praktiškai nebūna. Heterozigotiniame organizme yra abiejų kodominuojančių genų veiklos produktų.

Pavyzdžiui, heterozigotų I^AI^B eritrocitai turi abu antigenus **A** ir **B**. Kai tuokiasi heterozigotiniai asmenys,

$$I^Ai \times I^Bi,$$

lygiai (1:1:1:1) gali gimti visų keturių **ABO** sistemos kraujo grupių vaikai (žr. p. 79). Kodominavimas – vienas dažniausių alelinių genų sąveikos tipų. Daugelis alelių, lemiančių mutantinį baltymą, pasireiškia heterozigotose. Jų buvimą galima nustatyti baltymų elektroforezės metodu.

Kai kuriais kodominavimo atvejais tarp geno alelių nebūna recesyviojo alelio. Tada iš fenotipo galima kategoriškai spręsti apie genotipą, pavyzdžiui, žmogaus M, N ir MN kraujo grupių sistemos:

M kraujo grupę lemia – genotipas L^ML^M,
N kraujo grupę – genotipas L^NL^N,
MN kraujo grupę – genotipas L^ML^N.
Kai tėvai **MN** × **MN**, palikuonys gali būti tokie: 1/4 **MM**:2/4 **MN**:1/4 **NN**.

> **Superdominavimas** – sąveika tarp alelinių genų, panaši į nevisišką dominavimą tuo, kad heterozigotiniai organizmai skiriasi nuo homozigotinių, tik yra ne tarpiniai, o požymių išsivystymu pralenkia abu homozigotinius tėvus (*AA* arba *aa*).

Superdominavimą galima užrašyti taip:

$$AA<Aa>aa$$

F_2 santykiai pagal genotipą ir fenotipą taip pat sutampa ir lygūs 1:2:1.

Alelinių genų sąveika esant pleiotropijai (gr. *pleon* – daugiau + tropos – kryptis). **Pleiotropija** – daugybinis geno poveikis daugeliui požymių. Tai ne kartą minėtas reiškinys. Ir dar kartą pavyzdžiu pasitarnaus hemoglobino mutacija – **siklemija**. Hemoglobino mutantinio β polipeptido 6-ojoje padėtyje vietoj glutamo rūgšties yra valinas. Homozigotų Hb^SHb^S eritrocitai yra pjautuvo formos (žr. 2.1 pav.). Prisiminkime, kad iš čia ir šios mutacijos pavadinimas – pjautuvo formos mažakraujystė, arba siklemija (angl. *sickle* – pjautuvas).

39. 1313

Heterozigotiniai asmenys Hb^AHb^S yra sveiki, todėl galima tvirtinti, kad normalus genas Hb^A visiškai dominuoja. Tačiau tokių žmonių būna kampuoti eritrocitai. Jie aiškiai skiriasi nuo normalių disko formos eritrocitų. Šiuo atžvilgiu yra nevisiškas dominavimas – eritrocitai tarpinės formos. Ištyrus heterozigotinių asmenų Hb^AHb^S kraują, rasti dvejopi hemoglobinai: Hb^A ir Hb^S, taigi pasireiškia kodominavimas. Tai, kad heterozigotiniai asmenys maliarijai yra atsparesni už homozigotinius, galima vertinti kaip superdominavimą.

Alelinių genų sąveikos priklausomybė nuo aplinkos. Tai problema, kažkada sukėlusi daug nereikalingų ginčų. Lysenkistai manė, kad tereikia įrodyti, jog pirmoji hibridų karta (F_1) yra nevienoda, ir grius visa genetika. Mendelio dominavimo dėsnis, kaip jis dabar suprantamas, skelbia, kad

> pirmojoje kartoje (F_1) hibridai yra vienodo genotipo – visi yra heterozigotiniai (*Aa*).

Alelinių genų tarpusavio sąveika priklauso nuo įvairių veiksnių, tarp jų ir nuo aplinkos veiksnių. Priklausomai nuo aplinkos sąlygų genas iš visiškai dominuojančio gali pasidaryti nevisiškai dominuojančiu ar net recesyviuoju. Siklemija gali būti ir pavyzdys, kaip laikinai pakinta dominavimo kryptis skirtingoje deguonies aplinkoje: kai trūksta deguonies (pvz., aukštikalnėse), heterozigotinių asmenų Hb^AHb^S eritrocitai ištįsta ir įgyja tokią pačią formą, kaip ir homozigotų Hb^SHb^S – pasireiškia mažakraujystė, bet kai deguonies daug, šių asmenų eritrocitai apvalėja.

Durnaropės (*Datura*), augančios vasarą natūraliomis sąlygomis, purpurinė spalva paprastai visiškai nustelbia žalią spalvą, tačiau šiltnamyje heterozigotiniai augalai aiškiai skiriasi nuo homozigotinių purpurinių augalų blyškesne spalva.

> Aplinkos veiksniai keičia geno ekspresiją (raišką), **fenotipinius** alelių santykius, bet genotipas nuo to nesikeičia. Šis poveikis įvairiems to paties geno aleliams nevienodas, todėl keičiasi sąveika tarp alelių heterozigotose.

9.5.1.2. Alelinių genų sąveikos priežastys

Nepaisant to, kad sąveika tarp alelinių genų (dominavimas) yra vienas lengviausiai nustatomų eukariotų genetikos reiškinių, iki šiol

ji nėra pakankamai išaiškinta. Daugelis alelinių genų pagal sąveikos pobūdį atitinka Beitsono ir Peneto geno buvimo ar nebuvimo teoriją, ir santykiai tarp to paties lokuso alelių dažnai yra kiekybiniai.

> Geno buvimo ar nebuvimo teorija labai paprasta: geno buvimas dominuoja prieš geno nebuvimą. Recesyvusis fenotipas yra tada, kai genas iškritęs, yra jo delecija arba įvykusi *nul* mutacija, kuri visiškai inaktyvina geną.

Dažniau būna *nul* mutacijos. Vadinasi, veikia tik vienas aktyvusis alelis, o atrodo, kad aktyvusis alelis stelbia kitą alelį.

Nevisišką dominavimą dažnai nulemia genų dozė:

Du aktyvūs aleliai (*AA*)	→	**Vienas aktyvus alelis (*Aa*)**	→	**Nėra aktyvaus alelio (*aa*)**
Stipriai išreikštas fenotipas		**Silpnesnis fenotipas**		**Recesyvusis fenotipas = požymis neišsivystė**

Ši teorija paaiškina gana didelės alelių grupės recesyvumą, tačiau daug klausimų lieka neatsakytų, kaip antai:

- kodėl kai kurios delecijos yra dominuojančios;
- kodėl tame pačiame lokuse yra įvairi alelių sąveika: vieni aleliai visiškai, kiti nevisiškai dominuojantys;
- kodėl genas ir vienoje dozėje yra visiškai dominuojantis, lemia normalų fenotipą, kaip tai būdinga minėtiems fenilketonurijos ar galaktozemijos genų normaliems aleliams.

Visiškai ir nevisiškai dominuojantys to paties lokuso aleliai. Raitas dar 1934 m., kai biocheminės genetikos dar nebuvo, ištyrė alelius vieno lokuso, kuris jūrų kiaulyčių plaukuose lemia melanino sintezę (už tai Raitas kartais vadinamas fiziologinės genetikos pradininku). Surikiavus alelius ir įvairių genotipų homozigotas ir heterozigotas, nustatyti trys dėsningumai (9.2 lentelė):

- normalusis alelis (*C*) visiškai dominavo, stelbdamas visus kitus alelius. Nepriklausomai nuo to, kokį melanino kiekį kodavo antrasis alelis, būdamas homozigotinėje būklėje, melanino kiekis heterozigotose su *C* aleliu nesikeitė, buvo pastovus;

- tarpusavio heterozigotose tų alelių, kuriuos visiškai slopino alelis *C*, pasireiškia nevisiškas dominavimas: pagal melanino kiekį šios heterozigotos buvo tarpinės tarp abiejų tėvinių homozigotų;
- alelius ir genotipus (išskyrus tuos, kuriuose yra visiškas dominavimas, t. y. heterozigotos su genu *C*) galima išrikiuoti į eilę pagal aktyvumą – melanino sintezę. Vadinasi, įvairūs to paties lokuso aleliai lemia nevienodą aktyvumą fermento, vykdančio melanino sintezę.

Atsakyti į aukščiau pateiktus klausimus ir paaiškinti, kada yra visiškas, o kada nevisiškas dominavimas, pavyko tik vėliau, kai buvo pakankamai toli pažengusi biocheminė – fermentų genetika.

Dominavimas ir alelinių genų raiškos ypatybės. Drozofilos *white* lokuso aleliai. Drozofilos *white* genas yra reguliacinis. Jo mutacijos keičia visų akies pigmentų sintezę lemiančių genų veiklą. Lokuse yra labai daug alelių (iki poros šimtų). Alelių sąveikai tirti pasirinkti keturi šio lokuso aleliai: W – tamsiai raudonos akys – normalus tipas, w^e – eozininės akys, spalva kaip dažo eozino, w^a – abrikosinės akys ir w – baltos akys, *nul* mutacija – akies pigmentai visiškai nesigamina.

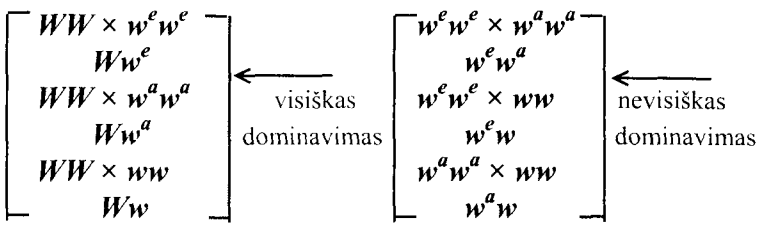
Drozofilos mutantinių linijų kryžminimo rezultatai visiškai sutapo su jūrų kiaulyčių melanino sintezės tyrimais. Hibridinių patelių

9.2 lentelė. **Melanino kiekis jūrų kiaulyčių plaukuose, esant įvairiems alelių deriniams** (pagal S. Wright, 1949)

Genotipas	Melaninas %	Fenotipas
C- (Cc^k, Cc^d, Cc^r,Cc^a, CC)	100	Sepija
c^kc^k	88	Tarpiniai
c^kc^d	65	"
c^dc^d	31	"
c^kc^r	54	"
c^kc^a	36	"
c^dc^r	19	"
c^dc^a	14	"
c^rc^r	12	"
c^rc^a	3	"
c^ac^a	0	Be melanino

GENOTIPŲ EILĖ (pagal melanino sintezės intensyvumą):
$c^ac^a<c^rc^a<c^rc^r<c^dc^a<c^dc^r<c^dc^d<c^kc^a<c^kc^r<c^kc^d<$
$<c^kc^k<Cc^a=Cc^r=Cc^d=Cc^k=CC$.

(*white* lokusas yra X chromosomoje, nors patinėlių fenotipai tokie patys dėl drozofilos X chromosomos genų dozės kompensacijos ypatumų, žr. p. 193) fenotipai buvo tokie:



Sukryžminus normalų tipą su mutantais, jų F_1 hibridams yra būdingas visiškas dominavimas, o sukryžminus mutantus tarpusavyje, pastebimas nevisiškas dominavimas.

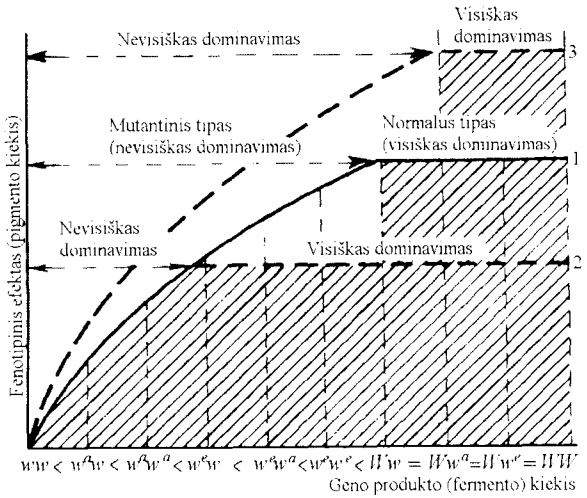
Pagal spalvos intensyvėjimą genotipus galima surikiuoti taip:

$$ww<w^aw<w^aw^a<w^ew<w^ew^a<w^ew^e<Ww = Ww^a = Ww^e = WW.$$

Pirmiausia kuo skiriasi alelinių genų veikla, kad atsiranda kiekybiniai fenotipų skirtumai, kuriuos lemia skirtingi aleliai. Abu nagrinėti lokusai (melanino ir *white*) lemia metabolito sintezę. Metabolito sintezė priklauso nuo fermento. Aleliai ir lemia skirtingą suminį fermento aktyvumą, nes dėl mutacijų fermento sintezės pokyčiai gali būti įvairūs:

- gali pakisti pačių fermento molekulių aktyvumas iki visiškai neaktyvaus baltymo (*nul* mutacija), t. y. kai fermento sintezė visiškai nevyksta. Pasitaiko, kad gaminasi imunologinėmis savybėmis tapatus aktyviam fermentui, bet visiškai neaktyvus baltymas. Šis baltymas vadinamas **CRM** (angl. *cross reacting material* – kryžmiškai reaguojanti medžiaga). Kitais atvejais, nors baltymas sintetinamas, jo aktyvumas yra pakitęs, silpnesnis;
- gali pakisti fermento molekulių skaičius;
- dėl mutacijų, kurios nulemia fermento sandarą, gali pakisti fermento jautrumas įvairiems reguliaciniams veiksniams – aktyvatoriams, inhibitoriams.

Kad būtų paprasčiau paaiškinti, kodėl vieni aleliai visiškai, o kiti nevisiškai dominuoja, tarkime, kad visi tirti aleliai lemia skirtingą fermento kiekį, o tyrimų trukmė, substrato kiekis ir kiti veiksniai, kurie gali paveikti pasigaminusio produkto (pigmento) kiekį, yra pastovūs dydžiai. Kaip priklausys pasigaminusio produkto kiekis nuo



9.15 pav. **Dinaminis/suminis dominavimo aiškinimas:** užbrūkšniuota visiško dominavimo zona; *1* – normalus substrato kiekis; *2* – mažesnis substrato kiekis; *3* – didesnis substrato kiekis

fermento kiekio, yra gerai žinomas dėsnis. Produkto (pigmento) kiekis didės proporcingai fermento kiekiui tik iki tam tikros ribos. Tą ribą nustato substratas. Produkto kiekis tol didės, kol per bandymo laiką bus perdirbtas visas substratas. Daugiau produkto nesigamins, ir kreivė, vaizduojanti fermento priklausomybę nuo pasigaminusio produkto kiekio, pasidarys plokščios formos (9.15 pav.).

Nesunku visus genotipus pagal drozofilos akių pigmento daugėjimą sutalpinti ant abscisių ašies (9.15 pav.) manant, kad *ww* visiškai nelemia fermento sintezės, $w^a w$ – jau šiek tiek nulemia, bet du abrikosiniai genai $w^a w^a$ veikia dvigubai stipriau, vienas eozinis genas $w^e w$, aktyvesnis už du abrikosinius $w^a w^a$, o du $w^e w^e$ dvigubai aktyvesni už vieną w^e ($w^e w$). **Įsotinimo taškas** (plokštuma) bus pasiektas, kai bus heterozigota ***Ww***. Nuo šio taško pigmento nedaugėja, nepaisant to, kad genotipai yra įvairūs: Ww^a, Ww^e ir *WW*. Pradedant *Ww*, normalus genas ***W*** visiškai dominuoja prieš bet kurį mutantinį alelį.

> **Visiškai dominuojantis** genas yra toks, kuris vienoje dozėje lemia tokį suminį fermento aktyvumą, kad jo pakanka visam substratui perdirbti.

Tokia savybe *white* lokuse pasižymi genas *W*. Užtenka jo viengubos dozės. Bet kurio kito alelio priedas prie jo (Ww^a, Ww^e ar netgi

WW) nekeičia pigmento kiekio. Toje kreivės dalyje, kurioje nepasiekta riba, galioja geno dozės principas ir nevisiškas dominavimas. Kad yra tam tikras slenkstis, kurį peržengus tolesnis geno dozės didėjimas neveikia fenotipo, įrodoma ir specialiais būdais padidinus genų skaičių iki 3–4. Taip padidinus w^e alelių skaičių iki 3, t. y. $w^e w^e w^e$, gaunamos normalios spalvos akys – pasiekiamas įsotinimo taškas (būtina sąlyga, kad 3-iasis w^e genas būtų autosomoje, nes *white* lokusas yra X chromosomoje, ir jam galioja dozės kompensacijos reiškinys.

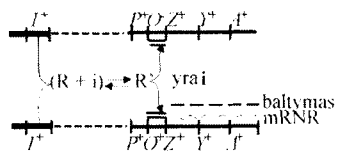
Dominavimo pokyčiai. „Fermento-substrato" santykiu galima paaiškinti ir dominavimo priklausomybę nuo aplinkos. Sumažėjus substrato kiekiui (9.15 pav., *2*), kad vieno alelio w^e (kai genotipas $w^e w$) nulemiamo fermento pakaktų perdirbti visą substratą, šis alelis iš nevisiškai dominuojančio pasidarys visiškai dominuojančiu. Ir atvirkščiai, didinant substrato kiekį (9.15 pav., *3*), kai kuriose heterozigotose (konkrečiai *Ww*) alelis *W* taps nevisiškai dominuojančiu, nes vieno geno *W* produkto nepakaks pasiekti įsotinimo tašką.

Izoaleliai. „Fermento-substrato" santykiu galima paaiškinti ir normalų fenotipą, kuris būdingas izoaleliams. Prisiminkime, kad izoaleliai homozigotinėje būklėje lemia fenotipą, tapatų normaliam fenotipui, kurį lemia visiškai dominuojantis genas. Tik jų heterozigotose su mutantiniais genais, kurių veikimas silpnesnis už izoalelio veikimą, pasireiškia nevisiškas dominavimas. **Izoaleliai yra mutantiniai genai, bet jau dėl dvigubos jų dozės** (eoziniio geno $\mathbf{w^e}$ šiam efektui būtina triguba dozė) **pasireiškia aktyvumas, prilygstantis vieno normalaus visiškai dominuojančio geno lemiamam aktyvumui**. Izoalelio heterozigota su bet kuriuo ne tokiu aktyviu aleliu šio lygio nepasiekia, ir šios heterozigotos fenotipas yra tarpinis, t. y. genas nevisiškai dominuoja. Tik heterozigotos tarp dviejų izoalelių arba izoalelio ir normalaus geno bus normalaus fenotipo.

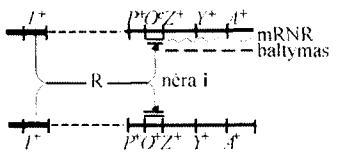
Geno funkcija ir dominavimas. Dominuojančiosios ir recesyviosios valdymo genų mutacijos. Prancūzų mokslininkai Žakobas ir Mono ne tik sukūrė vienos iš centrinių genetikos problemų – genų veiklos valdymo pamatus, bet ir išsprendė, kada valdymo genų mutacija yra dominuojanti, o kada recesyvioji. Ir tai buvo padaryta specialiai, nes jie tyrimus atliko su *Escherichia coli*. Tai objektas, kuriam natūraliai dominavimas nepasireiškia. Žakobas specialiai sukūrė **merozigotas**, kad galėtų tirti valdymo genų (operatoriaus ir geno-reguliatoriaus) heterozigotas.

Merozigotos – laikina iš dalies diploidinė bakterijų ląstelės būsena, atsirandanti dėl konjugacijos, transdukcijos ar transformacijos.

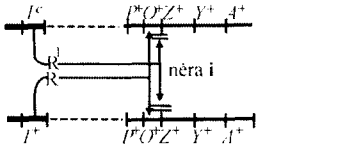
Geno-reguliatoriaus koduojamas produktas represorius jungiasi su operatoriumi, kai nėra induktoriaus. Induktorius – tai junginys (šiame operone galaktozidas), kuris indukuoja operono veiklą. Kaip minėta, struktūrinių genų mutacijos pakeičia (nutraukia) tik konkretaus baltymo – fermento sintezę. Valdymo genų mutacijos keičia visos jų valdomos genų grupės veiklą. Operatoriaus ir reguliatoriaus mutacijos skirtingai sąveikauja su normaliais alleliais laikinose merozigotose:



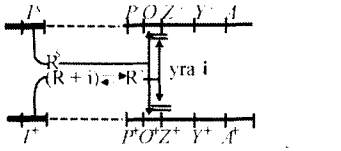
operatoriaus nul mutacija O^- yra **recesyvi**, nes esant induktoriui, antrasis operonas yra veiklus;



– *operatoriaus* O^C mutacija yra **konstitutyvi** ir **dominuojanti**, nes pakitusio O^C neslopina represorius R ir tada, kai nėra induktoriaus;



– *reguliatoriaus* I^C mutacija (I– *nul* arba I^{-D}) yra **konstitutyvi** ir **recesyvi**, nes R neatpažįsta operatoriaus, kai nėra induktoriaus, normalus represorius R slopina abu operonus;



– *reguliatoriaus* I^S mutacija yra **superrepresorius**, slopina operoną ir kai yra induktorius i, nes dėl mutacijos R negali sąveikauti su i. Ši mutacija yra **dominuojanti** - R^S slopina abu operonus.

(Čia *O* – operatorius, *I* – reguliatorius, *P* – promotorius, *Z*, *Y* ir *A* – struktūriniai genai, *R* – represorius, i – induktorius.)

Žmogaus mutacijų dominavimo priežastys. Fogelis ir Motulskis pabandė apibendrinti duomenis apie tai, kokios žmogaus mutacijos yra dominuojančios (9.3 lentelė). Tai daugiausia mutacijos genų, lemiančių

9.3 lentelė. **Žmogaus dominuojančių mutacijų priežastys**
(pagal F. Vogel, A.G. Motulsky, 1997)

Pokytis	Pavyzdys
Nenormali baltymo subvienetų agregacija	Nenormalus fibrinogenas
Multimerinio baltymo veiklos sutrikimas dėl nenormalaus subvieneto	Nestabilūs hemoglobinai
Ląstelių receptorių defektai	Porfirindeaminazės stoka esant ūmiai besikaitaliojančiai porfirijai
Ląstelės receptorių defektai	LOL (mažo tankio lipoproteino) cholesterolio receptoriaus defektas, esant šeiminei hipercholesterolemijai (padidėjusiam cholesterolio kiekiui)
Ląstelės membranos defektai	Paveldima sferocitozė (mikrosferocitai kraujyje sergant mažakraujyste)
Nenormalaus fibrilinio baltymo nusėdimas periferiniuose audiniuose	Paveldimos amiloidozės (amiloidų susitelkimas audiniuose)
Nenormalaus fibrilinio baltymo nusėdimas smegenyse	Alheimerio liga
Paplitusių ir pagrindinių baltymų sandaros defektai	Jungiamojo audinio anomalijos: *osteogenesis imperfecta* (kaulinio audinio susidarymas – nebaigta forma), Marfano sindromas („voro pirštai" – arachnodaktilija), Ehlerio-Danloso sindromas
Pakitusi sąveika (susilpnėjusi) su kitu baltymu	Hipertrofinė kardiomiopatija (širdies raumens liga) dėl miozino geno mutacijos
Homeobloką turinčių (morfogenezės) genų mutacijos	Waardenburgo sindromas (žr. 5.1 lentelę)

labai svarbius, bendro pobūdžio procesus arba reiškinius. Bet tai dar nepaaiškina, kodėl šios mutacijos yra dominuojančios. Pvz., ląstelės receptorių mutacijos gali būti ir recesyviosios.

Kai kurių mutacijų dominavimo priežastys aiškios, kaip ir operatoriaus ar geno-reguliatoriaus. Mutantinių alelių pasireiškimo pobūdis toks, kad mutantinis alelis „gadins reikalus" tiek vienas – homozigotose, tiek heterozigotose, kurių genotipe yra ir normalus alelis. Taip superrepresorius slopins operoną nepriklausomai nuo to, kad heterozigotose yra ir normalus geno-reguliatoriaus alelis. Lygiai taip pat nenormalus fibrilinis baltymas nusės periferiniuose audiniuose (amiloidozė) ar smegenyse (Alheimerio liga). Heterozigotiniai asmenys tik galbūt sirgs švelnesne ligos forma.

Vadovaujantis šia logika, ir mutantiniai hemoglobino β polipeptidai heterozigotų pagal siklemijos geną eritrocituose turėtų jungtis į

ilgus agregatus, būdingus mutantiniam baltymui homozigotose. Tačiau esant pakankamam deguonies kiekiui, taip neatsitinka. Tik kai trūksta deguonies, heterozigotinių asmenų eritrocitai ištįsta, kaip ir homozigotinių asmenų eritrocitai. Vadinasi, dominavimui pasireikšti reikalingos tam tikros aplinkos sąlygos. Operatoriaus mutacijų savybės (dominavimas – recesyvumas) išryškėja tik per kitų jo valdomų genų veiklą. Be to, šie genai turi būti cis-padėtyje. Tad ir kiti genai, genotipinė aplinka, svarbi pasireikšti alelinių genų sąveikai.

9.5.2. Nealelinių genų sąveika

Nealelinių genų sąveika, atrasta Beitsono, šiuo metu yra viena iš svarbiausių ir sudėtingiausių genetikos problemų. Kadangi genotipas yra vieninga genetinė sistema, tai, genams sąveikaujant, išskiriama elementariausia forma – sąveika tarp dviejų nealelinių genų. Būtent elementariausi nealelinių genų sąveikos tipai ir nagrinėjami šiame skyriuje. Kartu pažymėtina, kad **nealelinių ir alelinių genų sąveikos tipai yra panašūs**, net juos lemiantys mechanizmai gali būti tapatūs.

Prieš 40–50 metų dėmesys nealelinių genų sąveikai buvo labai didelis, bet formalus: nustatyti įvairius sąveikos tipus ir įvertinti, kaip tai turėtų atsiliepti hibridams F_1, ypač F_2, kokiu santykiu gali pasiskirstyti F_2 hibridai.

Genų sąveiką lemia genomo sandaros ir geno veiklos valdymo ypatybės, todėl visa nealelinių genų sąveikos tyrimo pažanga tiesiogiai susijusi su šių dviejų genetikos problemų tyrimais. Vieni pirmųjų ir šioje srityje buvo Žakobas ir Mono, aptikę valdymo genus ir nustatę sąveiką tarp dviejų lokusų: *lac* operono ir geno-reguliatoriaus *I*.

Nealelinių genų veiklos suminiai poveikiai jau buvo žinomi ir anksčiau, po to, kai buvo aptikta polimerija ir poligenai. Juos papildė Bidlio ir Teitumo atradimas, kad net palyginti nesudėtingi požymiai, kaip metabolito sintezė, yra daugelio genų veiklos produktas, ir elementarus požymis yra vienas polipeptidas. Taip buvo išaiškinta viena pagrindinių komplementariosios genų sąveikos priežasčių. Atradus genome kartotinius genus, paaiškėjo polimerijos – poligenų sąveikos priežastis.

Skiriami du pagrindiniai nealelinių genų sąveikos tipai:

- modifikacinė-reguliacinė,
- sumavimosi.

9.5.2.1. Genai modifikatoriai. Epistaziniai genai

Kiekvienam požymiui galima išskirti **pagrindinį geną** (arba genus), be kurio (arba be kurių) požymis nesivysto, ir **genus modifikatorius**, keičiančius pagrindinio geno savybes. Pats genas modifikatorius taip pat gali nulemti kokią nors organizmo savybę, bet gali atskiru fenotipu ir nepasireikšti. Tada jo vienintelė funkcija yra modifikuoti (ir valdyti) kito, nealelinio geno veiklą. Tuo pačiu metu pavienį geną veikia įvairiomis kryptimis daugybė kitų genų. Jie sudaro šiam genui **genetinę aplinką**, arba **genetinį foną**.

Genai modifikatoriai keičia tokias geno ypatybes:

- veiklą, sustiprindami arba susilpnindami ją;
- penetrantiškumą ir ekspresyvumą;
- alelinių genų sąveikos pobūdį;
- mutavimo dažnį.

Genai modifikatoriai svarbūs praktiniu atžvilgiu. Jais galima susilpninti nepageidaujamas savybes ir sustiprinti pageidaujamas. Taip Herefordo veislės galvijai buvo išgelbėti nuo akių vėžio. Akių vėžiu serga galvijai su nepigmentuotais akių vokais. Modifikatoriais pigmentacija akių vokuose buvo padidinta.

Kaip genai modifikatoriai gali pakeisti geno penetrantiškumą ir dominavimo kryptį, galima spręsti iš 9.4 lentelėje pateiktų duomenų. Normali drozofilos sparnų forma (vg^+) beveik 100% dominuoja prieš įvairius alelius, lemiančius rudimentinius sparnus. *M* (angl. *minute* – smulkus) genai heterozigotose vg^+vg šią savybę susilpnina kiekybiškai. Šis modifikatorius kai kuriuos recesyviuosius alelius (vg^{mw} ir vg^{mo2}) paverčia visiškai dominuojančiais.

9.4 lentelė. **Kai kurių *M* (*Minute*) genų poveikis vg^+ dominavimui** (pagal M. M. Green, 1946)

Genai modifikatoriai	Normalių drozofilų %, esant heterozigotoms		
	vg^+vg	$vg^+ vg^{mw}$	vg^+vg^{mo2}
—	99,2	97,8	95,3
M(2)1	68,8	12,1	5,4
M(1)n	27,6	–	–
M(3)w	12,4	0,0	0,0

Genai modifikatoriai, kurie padidina kitų genų mutavimo dažnį, vadinami **genais mutatoriais**, o tie, kurie mutavimo dažnį mažina, – **antimutatoriais**.

Genų veikla dėl genų modifikatorių gali kisti abiem kryptimis: aktyvacijos arba slopinimo. Aktyvatorių tipo dažniausiai yra valdymo genai. Jie nustatomi molekulinės genetikos metodais, sugretinus jų normalaus ir mutantinio alelių veiklą. Hibridų kartose tokie genai turi sustiprinti pagrindinio geno veiklą. Antai sukryžminus melsvai rudus (ši spalva priklauso nuo melanino kiekio) balandžius su baltais, F_1 hibridai yra juodi, o F_2 palikuonys susiskaido į 3 grupes santykiu 9:3:4, būtent:

P	*AA bb*	×	*aa BB*					
	melsvai rudi		balti					
F_1			*Aa Bb*					
			juodi					
F_2	*9A– B–*	:	*3A– bb*	:	*3aa B–*	:	*1aa bb*	
	juodi		melsvai rudi		balti		balti,	

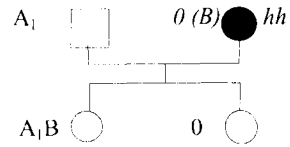
čia *A* – pagrindinis melanino sintezės genas, lemiantis melsvai rudą spalvą; be jo melaninas nesintetinamas; *a* – recesyvusis jo alelis, *nul* mutacija; *B* – modifikatorius, sustiprinantis melanino sintezės geno veiklą; *b* – recesyvusis jo alelis, *nul* mutacija.

Epistaziniai yra valdymo **genai**, slopinantys nealelinių genų veiklą. Pati sąveika vadinama **epistaze** (gr. *epistasis* – vyravimas). Epistaziniai genai žymimi ***I, i*** (inhibitorius) arba ***Sup, sup*** (supresorius). Šią sąveiką lengviau tirti. Paprastai epistazinis genas slopina visus hipostazinio (to, kuris slopinamas) lokuso alelius. Antra vertus, epistaziniai genai pagal dominavimo savybę gali būti įvairūs: dominuojantys, recesyvieji, gali pasireikšti dviguba arba mišri epistazė (9.5 lentelė).

Kol kas sunku paaiškinti **dvigubos epistazės** sąveikas. Manoma, kad šiais atvejais sąveika vyksta geno produktų lygiu. Jiems sąveikaujant iš dviejų aktyvių genų produktų susidaro vienas – neaktyvus.

Genus modifikatorius žmogaus genome tirti sunku, nors, savaime suprantama, kad tokia sąveika vyksta ir tarp žmogaus genų. Recesyvioji epistazė yra neįprastu kraujo grupės ABO paveldėjimo atveju, kuris aptiktas vienoje etninėje grupėje šalia Bombėjaus, todėl šis reiškinys vadinamas šio Indijos miesto vardu. Recesyvusis alelis ***hh*** slopina kraujo grupių genus A_1, A_2 ir *B*, todėl galimos netikėtos kraujo

grupės. Pvz., šeimoje, kurioje tėvo kraujo grupė A_1, motinos – kraujo grupė 0, gali gimti palikuonis, kurio kraujo grupė A_1B:



Tai atsitinka todėl, kad motinos genotipe epistazinis genas *hh* slopina *B* alelį.

9.5.2.2. Suminės nealelinių genų sąveikos

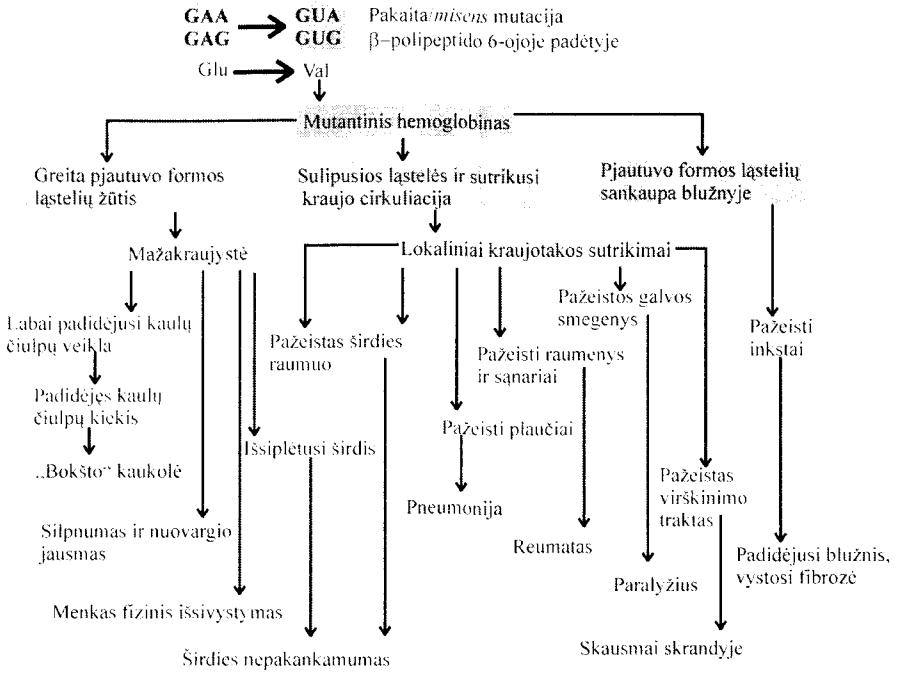
Požymis – daugelio genų veiklos rezultatas. Komplementarūs genai. Apie daugelį ne tik eukariotų, bet ir prokariotų požymių galima teigti, kad jie yra daugybės genų veiklos produktas.

Tai patvirtina ir **pleiotropijos**, arba geno daugybinės veiklos, reiškinys: vieno geno mutacija iš karto atsiliepia daugeliui požymių. Pleiotropija yra geriausias įrodymas, kad vieno geno veikla susijusi, suderinta su viso genomo veikla. Todėl nereikia stebėtis, kad vieno geno mutacija griauna, ir kartais labai stipriai, visą šią suderintą sistemą. Tai priklauso ir nuo geno svarbos, kokią vietą jis užima šioje sistemoje. Atrodytų nereikšminga vienos nukleotidų poros pakaita hemoglobino β polipeptido gene, o nukenčia visos organų sistemos (9.16 pav.). Aprūpinimas deguonimi, kaip ir CO_2 šalinimas, labai svarbus visų organizmo sistemų veiklai. Kartu tai akivaizdus įrodymas, kad nuo pleiotropinių mutacijų labiausiai nukenčia sudėtingiausios sandaros organizmai: stuburiniai gyvūnai, ypač žinduoliai.

Siklemija yra **santykinė pleiotropija**, kuri pasireiškia būtent todėl, kad genome visų genų veikla suderinta, ir vieno geno mutacija išderina visą sistemą arba didesnę ar mažesnę jos dalį. Sumažėjęs aprūpinimas deguonimi atsiliepia daugelio organų veiklai.

Sudėtingiau įrodyti **tikrąją pleiotropiją,** kai genui iš tikrųjų būdinga daugybinė veikla: vienose ląstelėse jis lemia vienas, kitose – kitas savybes, veikia skirtingose genų grupėse.

Kad daugelio nealelinių genų veikla sumuojasi, pirmasis 1908 m. įrodė švedų mokslininkas Nilsonas-Elė (H. Nilson-Ehle), bet tai gali pasireikšti dviem būdais:



9.16 pav. **Santykinė pleiotropija dėl mutacijos hemoglobino β polipeptido gene**

- požymis yra daugelio darniai, bet savarankiškai veikiančių vieno paskui kitą genų veiklos rezultatas; tai būdinga **komplementariems** genams;
- požymis yra genų veiklos paprasto sumavimosi rezultatas; tai būdinga **poligenams**.

Komplementari nealelinių genų sąveika pasireiškia įvairiais būdais (žr. 9.5 lentelę). Dažniausiai pasitaikanti ir suprantamiausia tokia sąveika, kai, sukryžminus du mutantus, hibriduose atsistato normalus požymis. Tai **komplementacijos** reiškinys, apie kurį ne kartą rašyta ir kuris naudojamas genetikoje nustatyti, keli genai lemia požymį (žr. p. 77). Dažnai skirtingų, nealelinių genų mutacijos yra vienodo fenotipo, t. y. vienodos išvaizdos. Mat, kaip jau minėta, požymis pasireiškia ne iš karto, bet per daugelį tarpinių grandžių (reakcijų), ir kiekvieną jų gali paveldimai blokuoti mutacija. Tai galima pavaizduoti taip:

$$\begin{matrix} m_1 & m_2 & m_3 & m_n \\ \downarrow & \downarrow & \downarrow & \downarrow \end{matrix}$$

$A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow \cdots\cdots\rightarrow$ Galutinis produktas (požymis),

9.5 lentelė. **Skilimo santykiai F_2, esant įvairiems epistazės ir komplementarios sąveikos tipams**

Genų sąveikos pobūdis	1/16 *AA BB*	2/16 *AA Bb*	2/16 *Aa BB*	4/16 *Aa Bb*	1/16 *AA bb*	2/16 *Aa bb*	1/16 *aa BB*	2/16 *aa Bb*	1/16 *aa bb*
	Genų derinys zigotose								
Nealeliniai genai nesąveikauja	9				3		3		1
A. EPISTAZĖ									
1. Recesyvioji epistazė (*aa* > *B* ir *b*)	9				3		4		
2. Dominuojančioji epistazė *A* > *B* ir *b*	12						3		1
	13						3		
3. Mišrioji epistazė *A* > *B* ir *b* *bb* > *A* ir *a*	13						3		
4. Dviguba recesyvioji epistazė *aa* > *B* ir *b* *bb* > *A* ir *a*	9				7				
5. Dviguba dominuojančioji epistazė *A* > *B* ir *b* *B* > *A* ir *a*	15								1
Pastaba: > - stelbimo ženklas; neatžymėti (pavaizduoti baltai) fenotipai, kai pasireiškia epistazė; kiti fenotipai atžymėti.									
B. KOMPLEMENTARI SĄVEIKA									
Genų sąveikos pobūdis	1/16 *AA BB*	2/16 *AA Bb*	2/16 *Aa BB*	4/16 *Aa Bb*	1/16 *AA bb*	2/16 *Aa bb*	1/16 *aa BB*	2/16 *aa Bb*	1/16 *aa bb*
	Genų derinys zigotose								
Abu genai savarankiški, jų sąveika - *A-B-* yra naujas fenotipas					3		3		1
Papildomi genai: *A* yra savarankiškas, *B* yra papildomas; *A-B-* naujas fenotipas	9				3		4		
Abu genai *A* ir *B* savarankiški ir lemia tą patį fenotipą; *A-B-* ir *aabb*- nauji fenotipai	9				6				1
Požymis išsivysto tik tada, kai abu *A-B-* genai genotipe	9				7				

Pastaba: stipriausiai patamsinti nauji fenotipai, silpniau patamsinti kiti fenotipai, neatžymėti (pavaizduoti baltai) fenotipai, kai požymis nesivysto.

čia m_1–m_n – konkrečias reakcijas/virsmus lemiančių genų mutacijos, ***A, B, C, D...*** – nealeliniai dominuojantys genai. Šio tipo komplementari sąveika būna ir tarp nealelinių genų, nulemiančių skirtingus to paties sudėtinio baltymo polipeptidus (domenus).

Komplementariems genams bendra tai, kad hibriduose dėl dviejų ar daugiau nealelinių genų sąveikos pasireiškia naujas fenotipas, nebūdingas atskirai veikiantiems (dažniausiai mutantiniams) genams.

Komplementarios sąveikos būdu paveldima labai daug požymių. Dažnai ir žmogaus tą patį paveldimą defektą (tokio paties arba panašaus fenotipo) nulemia skirtingi, nepriklausomai paveldimi nealeliniai genai, būtent diabetą, raumenų distrofiją, schizofreniją, kurčnebylumą ir kt. Šeimose, kuriose abu tėvai turi tokį patį, bet lemiamą nealelinių genų paveldimą defektą, vaikai būna normalūs.

Pavyzdžiui, dviejų kurčnebylių, kai jų santuoka atitinka formulę ***AA bb × aa BB***:

P $\frac{A}{A}\ \frac{b}{b}$ × $\frac{a}{a}\ \frac{B}{B}$

Mutantas 1 Mutantas 2

Lytinės ląstelės ***A b*** ***a B***

Palikuonys (F_1) $\frac{A}{a}\ \frac{B}{b}$ × $\frac{A}{a}\ \frac{B}{b}$

Normalaus fenotipo

F_2 9***A– B–*** : [3***A– bb*** : 3***aa B–*** : 1***aa bb***] ← bendras fenotipų santykis **9 : 7**

Normalaus fenotipo Mutantinio fenotipo

Normalus fenotipas būna tik tada, kai genotipe yra visų normalų požymį lemiančių genų veiklūs aleliai. Komplementari genų sąveika būna akivaizdi heterozigotose (jau F_1): hibriduose atsistato normalus fenotipas, sukryžminus du, dažnai tapačius mutantus.

Kaip viena iš komplementarios nealelinių genų sąveikos formų yra **papildomieji genai**. Jie galėtų būti priskiriami ir prie genų modifikatorių. Organizmai, kurių genotipe yra šie papildomieji genai, turi kokią nors papildomą savybę. Pavyzdžiui, žmogaus eritrocitų paviršinių antigenų A ir B sintezę lemia genai I^A ir I^B, tačiau kai yra

genas *Se* (angl. *secretion* – išskyrimas), antigenų aptinkama ne tik ant ląstelių paviršiaus, bet ir kūno skysčiuose, tarp jų ir seilėse. Genas *Se* nekeičia geno I^A arba I^B veiklos (tuo ši sąveika skiriasi nuo genų modifikatorių), nors be šių genų ir genas *Se* nepasireikštų fenotipe. Jeigu abu tėvai pagal abu genus būtų heterozigotiniai, tai santykis F_2 būtų 9:3:4. Tokia sąveika gali būti visų genų, kurie koduoja signalinius polipeptidus, paviršinius receptorius, signalo nešiklius į branduolį, šaperonus.

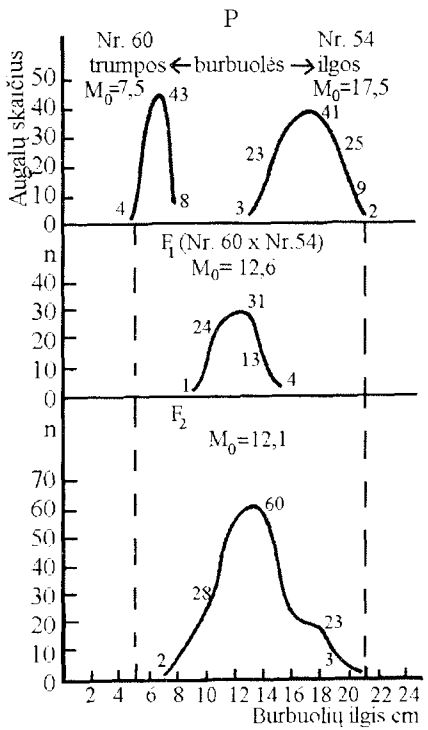
Kiekybinių požymių paveldėjimo ypatumai. Ryškiausiai genų veikla sumuojasi, kai paveldimi kiekybiniai požymiai. Šie požymiai sudaro labai svarbią grupę. Kūno masė, plaukų ilgis, atsparumas ligoms ir kitiems nepalankiems veiksniams, greitis, kokiu bėga lenktyniniai žirgai, ir masė, kurią patempia darbiniai arkliai, įvairių medžiagų kiekis organizme, intelektas ir kt., – visa tai kiekybiniai požymiai. Skirtumai tarp organizmų nustatomi įvairiais matavimo vienetais. Kaip tik šie požymiai itin svarbūs selekcijoje.

Tačiau formaliai kiekybiniai požymiai paveldimi ne pagal Mendelio dėsnius, t. y. F_1 hibridai nebūna vienodi, o F_2 nesiskaido į griežtai apibrėžtas fenotipų grupes, kurių būtų galima nustatyti santykinę dalį. Jokių santykių F_2 skaičiuoti negalima.

Kiekybiniams požymiams būdinga savybė, skirianti juos nuo kokybinių požymių – nuolatinis varijavimas, **variacinis kintamumas**. Jis pastebimas ir homozigotinėse, genetiškai grynose veislėse bei linijose.

Geriausia pradėti šį klausimą nagrinėti nuo pavyzdžio. Pasinaudokime vienu senu bandymu su kukurūzais. Emersonas (R. A. Emerson) ir Ystas (E. M. East) sukryžmino dvi kukurūzų grynąsias (inbred) linijas Nr. 60 ir Nr. 54 ir išanalizavo burbuolių ilgio paveldėjimą (9.17 pav.). Nors šios linijos buvo genetiškai grynos, bet kiekvienai linijai būdingas tam tikras požymio svyravimas: Nr. 60 burbuolės buvo nuo 5 iki 8 cm ilgio, Nr. 54 – nuo 13 iki 21 cm. Tėvų linijų svyravimo priežastis buvo aplinkos sąlygos, kurios net atskiras to paties augalo dalis gali veikti nevienodai. Statistiškai šie svyravimai išreiškiami **normalaus pasiskirstymo dėsniu**. Išskirtina grupė (klasė), kurioje individų yra daugiausia: tai linijos Nr. 60 klasė su 7 cm ilgio burbuolėmis arba linijos Nr. 54 klasė su 17 cm ilgio burbuolėmis. Ši

40. 1313



9.17 pav. **Kiekybinio požymio/ kukurūzų burbuolės ilgio paveldėjimas**

gausiausia klasė vadinama **modaline klase**, arba **moda**. Moda – vidutinis požymio dydis (šiuo atveju vidutinis burbuolių ilgis), bet ne aritmetinis vidurkis: su tokio ilgio burbuolėmis yra daugiausia augalų. Kraštutinių individų, tiek mažėjimo (–), tiek didėjimo (+) kryptimi, kitaip vadinamų „plius" ir „minus" variantų (statistikoje atskiras stebėjimas – variantas), yra mažai.

Nepaisant variacinio kintamumo, pasirinktos linijos Nr. 60 ir Nr. 54 viena nuo kitos aiškiai skyrėsi burbuolių ilgiu. Kiekybinio požymio paveldėjimo rezultatai hibridų kartose vaizduojami grafiškai: histogramomis, arba kreivėmis, kaip tai parodyta 9.17 paveiksle. Nagrinėjamojo pavyzdžio rezultatai tokie:

- F_1 burbuolės pagal ilgį yra tarpinės tarp motininių linijų: jos 9–15 cm ilgio, moda – 12,6 cm.

- F_2 labai didelis burbuolių ilgio svyravimas – nuo 7 iki 21 cm, t. y. nuo kraštutinių linijos Nr. 60 „minus" variantų iki kraštutinių linijos Nr. 54 „plius" variantų. Modalinė klasė yra 12,1 cm ilgio burbuolės, t. y. F_1 ir F_2 modalinės klasės maždaug sutampa. F_2 variacinis kintamumas yra kur kas didesnis už F_1, nes jį nulemia ne tik aplinkos veiksniai, bet ir genotipų įvairovė F_2.

Polimerija. Poligenai. Nilsonui-Elei tiesiog pasisekė, kad jis kryžmino daug kviečių ir avižų veislių, kurių grūdų spalva alternatyvi: kviečių buvo raudona ir balta, avižų buvo juoda ir balta.

F_2 hibridai buvo įvertinti dvejopai:

- apytikriai suskirstyti tik į dvi grupes, pvz., kviečiai raudongrūdžiai ir baltagrūdžiai,
- smulkiau suskirstyti pagal atspalvius.

Požymis tas pats, o įvairių veislių derinių rezultatai skirtingi, todėl patyrusiam genetikui, koks buvo Nilsonas-Ele, buvo aišku, kad tą patį požymį – grūdų spalvą (raudoną ar juodą) – įvairiuose genotipuose (veislėse) **lemia skirtingas genų skaičius**:

suminiai rezultatai raudona : balta	**pagal atspalvius**	**rezultatas atitinka**
3 : 1	1: **2** :1	– monohibridinį kryžminimą – **1 genų pora,**
15 : 1	1:4: **6** :4:1	– dihibridinį – **2 genų poros,**
63 : 1	1:6:15: **20** :15:6:1	– trihibridinį – **3 genų poros**.

Labai pravertė F_2 hibridų skirstymas pagal grūdų atspalvius. Paaiškėjo, kad fenotipas, t. y. spalvos intensyvumas, yra tiesiog dominuojančių nealelinių ir alelinių genų veiklos suma. F_1 visais atvejais buvo tarpinė tarp tėvinių veislių, nes turėjo perpus mažiau dominuojančių genų, negu motininis augalas – homozigota pagal visus dominuojančius genus. F_2 spalvos intensyvumas priklausė nuo bendro dominuojančių genų skaičiaus (9.6 lentelė). Nilsonas-Elė padarė dvi svarbias išvadas:

- pirma, fenotipų klasės visiškai atitinka normalaus paskirstymo dėsnį, tik yra labai mažas n (viršuje modalinės klasės paryškintos kvadratėliais);
- antra, genų veikla sumuojasi; fenotipo (spalvos) intensyvumas priklauso nuo dominuojančių genų skaičiaus (9.6 lentelė).

Nealeliniai genai, kurie lemia tą patį požymį ir kurių veikimas sumuojasi, vadinami **poligenais**, arba **adityviaisiais** genais, o sumavimosi reiškinys – **polimerija** (gr. *polymereia* – sudėtingumas).

Poligenai dažniausiai žymimi ta pačia raide ir prie jos pirašomas papildomas simbolis (indeksas), pvz., A_1, A_2, A_3...(kaip 9.6 lentelėje).

9.6 lentelė. **Kviečių grūdų spalvos paveldėjimas įvairiose veislėse ir jų hibriduose** (pagal H. Nilsoną-Elę)

Tėvai (**P**)		F_1		F_2 genotipai
genotipai	fenotipai	genotipai	fenotipai	fenotipai
Viena genų pora *AA*×*aa*	R×b	*Aa*	Tarpiniai	2/4 *Aa* Tarpiniai kaip F_1 : 1/4 *aa* Balti (b)
Dvi genų poros $A_1A_1A_2A_2 \times a_1a_1a_2a_2$	R×b	$A_1a_1A_2a_2$	Tarpiniai	Sumuojasi→ (2/16 $A_1A_1A_2a_2$) (2/16 $A_1a_1A_2A_2$) ↓ (4/16 $A_1a_1A_2a_2$) (1/16 $A_1A_1a_2a_2$) (1/16 $a_1a_1A_2A_2$) ↓ (2/16 $A_1a_1a_2a_2$) (2/16 $a_1a_1A_2a_2$) ↓ : 4/16 *AAAa* Šviesesni : 6/16 *AAaa* Kaip F_1 : 4/16 *Aaaa* Šviesiai raudoni : 1/16 $a_1a_1a_2a_2$ Balti kaip tėvinio augalo (b)
Trys genų poros $A_1A_1A_2A_2A_3A_3 \times$ $\times a_1a_1a_2a_2a_3a_3$	R×b	$A_1a_1A_2a_2A_3a_3$	Tarpiniai	6/64 *AAAAAa* : Šviesesni : 15/64 *AAAAaa* : Dar šviesesni : 20/64 *AAAaaa* : Kaip F_1 : 15/64 *AAaaaa* : Šviesiai raudoni : 6/64 *Aaaaaa* : Labai šviesiai raudoni : 1/64 $a_1a_1a_2a_2a_3a_3$ Balti kaip tėvinio augalo (b)

R – raudoni grūdai; **b** – balti grūdai;
F_2 fenotipų santykiai 1:2:1; 1:4:6:4:1; 1:6:15:20:15:6:1.

Poligenų, lemiančių kiekybinį požymį, skaičius labai įvairus. Kaip minėta, kūno spalvos (melanino sintezės) skirtumus tarp baltaodžių ir juodaodžių irgi lemia poligenai, bet jų skaičius, nustatytas Davenporto, ištiės labai nedidelis – 4–6 poros (žr. 9.10 pav.). Daugelį kiekybinių požymių lemia keli šimtai, net tūkstančiai genų. Esant tokiam dideliam genų skaičiui, kiekvieno jų įnašas į bendrą fenotipą būna mažas.

Kiekvieno poligeno svarba kiekybiniam požymiui yra tuo mažesnė, kuo daugiau genų nulemia šį požymį.

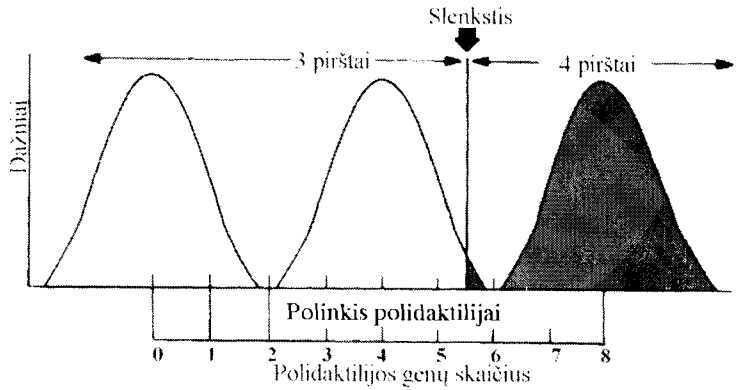
Tačiau poligenų įnašas į bendrą fenotipą gali būti nevienodas (ir šiuo atžvilgiu Nilsonui-Elei labai pasisekė, nes jo tirtų genų reikšmė buvo maždaug vienoda). Be to, buvo įrodyta, kad sumuojasi ne tik teigiamas (požymio intensyvumo kryptimi), bet ir neigiamas, taip pat teigiamas ir neigiamas poligenų poveikis. Vienas genas gali neutralizuoti kito geno veiklą.

Žmogaus daugiaveiksnis (multifaktorinis) paveldėjimas. Polinkis ir slenkstis. Gali atrodyti paradoksalu, bet kiekybinių požymių genetikos pažanga susijusi su žmogaus genetikos, ypač medicininės, problemomis.

Žmogaus ligos, kurias lemia didelis genų skaičius, vadinamos **daugiaveiksnėmis**. Tiek normalių kiekybinių požymių, tiek daugiaveiksnių (multifaktorinių) ligų fenotipinis pasireiškimas stiprėja daugėjant genotipe poligenų, veikiančių viena (ligos) kryptimi, bet būtina skirti du poligenų pasireiškimo etapus:

- iki tam tikros (veiklių poligenų skaičiaus) ribos didėja tik polinkis sirgti,
- daugiaveiksnė liga pasireiškia peržengus tam tikrą slenkstį (slenkstinę poligenų dozę).

Esant atitinkamoms sąlygoms, polinkis sirgti tiesiogiai gali virsti, pvz., infekcine liga. Jį gali sustiprinti ar susilpninti aplinkos veiksniai. Jie gali keisti slenkstinę ribą. Slenkstis tampa labilus. Genų dozė, reikalinga pasiekti slenkstį, gali kisti. Dėl šios priežasties kai kurie genetikai mano, kad slenkstis yra tik „patogus išradimas“ daugiaveiksnėms ligoms tirti.



9.18 pav. **Daugiaveiksnis paveldėjimas ir genų slenkstis:**
dvi jūrų kiaulyčių linijos – kairėje su trimis kojos pirštais (0–2 genai), dešinėje – su keturiais kojos pirštais (6–8 genai), viduryje – F_1 hibridas (nuo 2-jų iki 6-ių genų). Slenkstis tarp 5–6 genų. Dauguma F_1 hibridų su trimis kojos pirštais, bet pasitaiko su keturiais, kai genų dozė pasiekusi slenkstį (pagal S. Wright, 1931)

Slenksčio realumą įrodė Raitas, ištyręs, kaip paveldimas daugiaveiksnis jūrų kiaulyčių požymis polidaktilija (daugiapirštiškumas). Jūrų kiaulyčių genetinėse linijose genų skaičių galima kontroliuoti. Normaliai jūrų kiaulytės ant užpakalinių kojų turi 3 pirštus, bet vienos linijos gyvuliukai turėjo 4 pirštus. Polidaktiliją lemia 8 dominuojantys poligenai (4 nealelinių genų poros, arba kitaip 4 lokusai). Slenkstis nustatytas F_1 hibriduose: kai pasiekiamas 5–6 dominuojančių alelių skaičius genotipe, vystosi polidaktilija (9.18 pav.).

Puikus slenkstinės poligenų dozės pavyzdys yra α **talasemija** (žr. p. 281).

Prisiminkime, kad žmogaus hemoglobino α genų sankaupoje yra du α genai (duplikacija), vadinasi, normaliai kiekvienas žmogus turi keturis α genus. Talasemijos pasireiškimas priklauso nuo genų dozės:

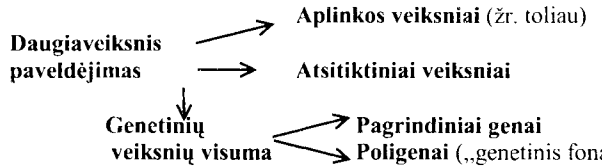
- **4 veiklūs** α **genai** (po du homologinėse chromosomose) – **norma**;
- **3** α **genai** – „tylus nešiotojas“, polinkis į mažakraujystę;
- **2** α **genai** – α **talasemija**, bet galimi du atvejai:
  - *α-thal-1* – abiejų α lokusų delecija vienoje chromosomoje;
  - *α-thal-2* – po vieną geno deleciją abiejose homologinėse chromosomose;
- **1** α **genas** – ryškus β polipeptido perteklius, todėl gali susidaryti neįprastas **tetrameras** β_4, t. y. pasireiškia vadinamoji **HbH liga**;
- **0 veiklių** α **genų** – **letali** anomalija *hydrops fetalis* (vaisiaus vandenė), vaisius žūva gimdamas arba iki gimimo.

Pagrindinio geno problema atsirado irgi daugiausia tiriant daugiaveiksnių požymių prigimtį. Įrodytas nekeliantis abejonių faktas, kad **kiekybinį požymį gali stipriai pakeisti vieno geno mutacija**. Antai įvykus augimo hormono geno mutacijai, asmuo yra mažo ūgio. Hormonu fenotipą galima normalizuoti. Į nykštukinių pelių – mutanto *lit* (*little*) kiaušialąstes buvo perkeltas normalus augimo hormono genas, ir pelės ne tik pradėjo sintetinti hormoną, bet net tapo gigantiško dydžio. Lygiai taip pat vieno geno mutacija gali pakeisti intelektą, pvz., fenilketonurijos geno ar *FRAX* saito žmogaus X chromosomoje. V. Jefroimsonas genialumą aiškino vieno geno (Marfano sindromo, podagros – purinų apykaitos ir kt.) mutacijomis. Tuo tarpu įprasta tvirtinti, kad genetiškai genijus – tai ypač palankus poligenų derinys.

Kaip suderinti poligeninę kiekybinių požymių prigimtį su tokiu ryškiu ir neabejotinu vieno geno poveikiu požymiui? Tai labai svarbus ir bendras visiems eukariotams klausimas. Jau buvo rašyta apie žemaūgius žirnių mutantus, kurie naudojami augalų augimo hormonų kiekiui nustatyti. Tai irgi monogeniniai mutantai.

Yra genų, be kurių kiekybinis požymis apskritai nesivysto. Jie pavadinti **pagrindiniais**, o daugelio poligenų įnašas papildomas arba netiesioginis, ir juos būtų galima vertinti kaip **genus modifikatorius, genetinį foną**. **Pagrindinių genų gali būti keletas**. Tai įrodyta ištyrus įvairius požymius, pvz., augalų antociano sintezės paveldėjimą.

Fogelis ir Motulskis pateikia tokią daugiaveiksnio (kiekybinio) požymio raidos schemą:



Ši schema geriausiai atitinka šiuolaikinę kiekybinių požymių paveldėjimo sampratą, ir pagal ją turėtų vykti konkretaus kiekybinio požymio genetikos tyrimai. Schema tinka visiems eukariotams.

9.6. Paveldimumas ir aplinka

Genotipas ar aplinka – tai ne dvi viena kitą neigiančios alternatyvos. Priešingai, **nuo genotipo ir aplinkos veiksnių sąveikos** priklauso organizmo požymių ir savybių visuma – fenotipas. Svarbiausia

atsakyti į tai, kiek konkretus požymis priklauso nuo genotipo ir kiek nuo aplinkos. Svarbus šis klausimas veislininkystei, selekcijai, medicinai ir net, kaip minėta, tinkamai auklėjimo sistemai kurti. Tačiau ne visų požymių atžvilgiu lengva į šį klausimą atsakyti. Pavyzdžiui, nelengva nustatyti, kiek žmogaus gabumai priklauso nuo genotipo, o kiek nuo aplinkos. Šiuo metu pamatuotai abejojama **IQ** (angl. *intelligence quatient,* sudaromas taip, kad vidurkis būtų lygus 100) – intelekto potencialo rodikliu, kaip atskleidžiančiu tik genotipinius skirtumus. Jis priklauso ir nuo socialinių – aplinkos, šeimos sąlygų.

Sąveika tarp genotipo ir aplinkos tiriama dviem metodais:

- **įvairių genotipų organizmai auginami tomis pačiomis sąlygomis**. Taip gali būti tiriami įvairių veislių augalai ir gyvūnai. Pavyzdžiui, auginant keletą kviečių veislių netręštoje dirvoje ir patręšus mineralinėmis trąšomis įsitikinta, kad kviečių veislė 'Bezostaja 1' labiau už kitas reaguoja į tręšimą. Taigi atsakas į trąšas priklauso nuo genetinių augalų veislių savybių.
- **genetiškai vienodus organizmus auginti skirtingomis sąlygomis.** Šiuo atveju organizmai skirsis dėl aplinkos poveikio. Tačiau sunku gauti genetiniu atžvilgiu visiškai tapačius organizmus. Geriausia tokius tyrimus atlikti su klonais – vegetatyviniu būdu dauginamais vieno individo palikuoniais.

Dvynių metodas. Jis žmogaus genetikoje taikomas norint nustatyti santykį „genotipas–aplinka". Pasinaudojama genetiniais kilmės skirtumais tarp monozigotinių (identiškų) ir dizigotinių (neidentiškų) dvynių.

Monozigotiniai dvyniai yra kilę iš tos pačios zigotos dukterinių ląstelių. Pradėjus zigotai dalytis, dukterinės ląstelės dėl susilpnėjusių tarpląstelinių ryšių gali atsiskirti ir bent iki 8 ląstelių stadijos iš kiekvienos jų galėtų išsivystyti po normalų gemalą. Didžiausias identiškų dvynių skaičius iki šiol yra penkios sesutės Dion vieno kanadiečio šeimoje. Monozigotiniai dvyniai sudaro kloną. Jie visiškai tokio paties genotipo, todėl gali skirtis tik dėl aplinkos sąlygų poveikio. Tokios dvynių poros, kai abiem dvyniams išsivysto tas pats požymis, vadinamos **konkordantinėmis** (lot. *concordo* – sutariu, sutinku), o kai vienas dvynys turi požymį, o kitas ne, yra diskordantinės. Kuo daugiau konkordantinių porų, tuo labiau požymį lemia paveldimumas, o ne aplinka, ir atvirkščiai. Tačiau čia slypi pavojus apsirikti. Ta

pačia liga, pavyzdžiui, skarlatina, abu monozigotiniai dvyniai gali susirgti pirmiausia dėl to, kad auga vienodomis sąlygomis ir abu gali vienu metu apsikrėsti.

Dizigotiniai dvyniai yra kilę iš atskirų kiaušialąsčių ir yra skirtingų genotipų. Paprastai vienu metu baigia brėsti viena žmogaus kiaušialąstė, bet kaip anomalija gali pasitaikyti, kad subręsta dvi ir daugiau kiaušialąsčių. Kiek subręsta, tiek ir apvaisinama. Dizigotiniai dvyniai yra skirtingų genotipų. Jie skiriasi tiek, kiek skiriasi genotipai brolių ir seserų (sibsų), ne vienu laiku pagimdytų.

Lyginamas konkordacijos procentas tarp monozigotinių (MZ) ir dizigotinių (DZ) dvynių. Jeigu požymis priklauso nuo genotipo, tai diskordantinių porų tarp DZ dvynių turi būti daugiau negu tarp MZ dvynių, nes DZ porų nesutapimai atsiranda ne tik dėl aplinkos, bet ir dėl genotipo poveikio. Konkordantinių porų dažnis išreiškiamas procentais nuo bendro ištirtų dvynių skaičiaus; imamos tokios poros, kuriose nors vienas individas turi požymį. Kai konkordacijos procentas tarp MZ ir DZ dvynių vienodas, daroma išvada, kad požymis nuo genotipo nepriklauso (9.7 lentelė). Taigi lyginant konkordacijos procentą tarp MZ ir DZ dvynių, galima patikslinti genetinių veiksnių ir aplinkos poveikį požymiui. Antai susirgus tymais vienam dvyniui, užsikrečia jais ir antrasis, todėl konkordacijos procentas labai didelis, nesvarbu, ar dvyniai identiški, ar neidentiški. Panašiai yra ir su skarlatina. Todėl drąsiai galima teigti, kad šios užkrečiamosios ligos priklauso nuo aplinkos. Joms genotipo reikšmė minimali. Tačiau taip pat užkrečiamoji liga tuberkuliozė abiem DZ dvyniams pasireiškia tik 20–28 atvejais iš 100, o konkordantinių MZ dvynių porų yra 53–87%. Genotipo poveikis tuberkuliozei neabejotinas. Žinoma, šiuo, kaip ir poliomielito, atveju paveldimas arba polinkis sirgti, arba imunitetas.

Genų penetrantiškumas ir ekspresyvumas – savybės, būdingos eukariotų genams. MZ tyrimai akivaizdžiai rodo, kad ir to paties genotipo asmenys yra įvairūs, skirtingo fenotipo. Gali požymis visiškai nepasireikšti, kaip yra trečdalio MZ, kurių vienas monozigotinis dvynys serga, o kitas neserga schizofrenija.

Akivaizdu ir tai, kad geno penetrantiškumas yra geno ypatybė. Pateikti 9.7 lentelėje duomenys įtikinamai tai rodo: nuo genotipų/genų, kurių lemiamų požymių konkordacija nedidelė, iki 100% MZ konkordacijos pagal ABO kraujo grupes. Vadinasi, ABO kraujo grupių genų penetrantiškumas yra 100%, o schizofrenijos – tik 60–70%, nes geno penetrantiškumas išreiškiamas procentais.

41. 1313

9.7 lentelė. **Konkordantinių porų dažnio (%) tarp monozigotinių (MZ) ir dizigotinių (DZ) žmogaus dvynių palyginimas** (pagal F. B. Hutt, 1964; S. M. Geršenzoną, 1983; F. Vogel, A. G. Motulsky, 1997)

Liga	Konkordacija %		Liga	Konkordacija %	
	MZ	DZ		MZ	DZ
Užkrečiamosios ligos			Rachitas	88	22
Tymai	97-99	94-87	Šleivapėdystė	23	2
Difterija	50	38	Įgimtas klubo sąnario išnirimas	41	3
Poliomielitas	36	6	Nesuaugęs gomurys ir (ar) lūpa	37	11
Skarlatina	57-64	47	Skydliaukės hiperfunkcija	47	3
Pneumonija	32	18	Psoriazė	61	13
Tuberkuliozė	53-74-87	21-26-28	Ischeminė širdies liga	19	8,5
Raupai	60	20	Atopija (įgimta alergija)	50	4
Vėžys (apskritai)	17-16	11-14	Tulžies latako akmenligė	27	6,5
Krūties vėžys	5,5	3	Hipertonija	62	35
Gimdos vėžys	6	0	Sarkoidozė (liga, pasireiškianti gumbeliais odoje ir vidaus organuose)	50	8,5
Skrandžio vėžys	27	4			
Psichikos ligos			**Normalūs požymiai**		
Epilepsija	67	3			
Maniakinė depresija	77	19	ABO kraujo grupės	100	64
Schizofrenija	67-76-86	15-13-14,5	Antakių forma	100	51
Įvairios ligos			Akių spalva	99,5	28
Cukraligė	56-83-84	7-11-20	Plaukų spalva	97	23

Geno penetrantiškumas (lot. *penetro* – įsiskverbimas) – tai procentais išreiškiamas dažnis, kuriuo genas pasireiškia fenotipe, kai yra genotipas, būtinas požymiui išsivystyti.

Geno ekspresyvumas – geno/genotipo lemiamo požymio įvairovė, skirtinga požymio išraiška, nors genotipas yra tas pats.

Tačiau genų ekspresyvumą vertinti reikia atsargiai. Paaiškėjo, kad ten, kur anksčiau manyta, jog požymį lemia vienas genas, gali būti keli genai arba bent skirtingi to paties geno aleliai. Atrodė, geras geno ekspresyvumo pavyzdys yra mėlyna akių odena. Pagal šią savybę yra 100%-inis penetrantiškumas. Tačiau žmonės su mėlyna akių odena gali būti kurti, jų kaulai gali būti trapūs. Šios dvi ypatybės pasireiškia anaiptol ne visiems asmenims su mėlyna akių odena. Kurtumas ir kaulų trapumas išsivysto tik 44% asmenų su mėlyna akių odena; kurtumu pasižymi tik 60% asmenų, o kaulų trapumu – 63% asmenų su mėlyna akių odena. Tačiau šiuo metu nustatyta, kad ši įvairovė yra ne dėl skirtingo vieno geno ekspresyvumo, o todėl, jog mėlyną akių odeną lemia keli genai, ir fenotipų skirtumą gali lemti skirtingi genai.

Santykis „genotipas – aplinka“. Pagal šį santykį genai labai įvairūs: pradedant visišku nepriklausymu nuo aplinkos (kraujo grupių

genų) ir baigiant labai dideliu fenotipiniu paslankumu, apibūdinamu kaip **reakcijos norma**: lemiamas ne konkretus požymis, o **ribos**, kuriose varijuoja geno veikla priklausomai nuo aplinkos veiksnių. Tai turi prisitaikomą reikšmę. Kai kuriais atvejais reakcijos norma pasireiškia dviem alternatyviais fenotipais, „arba–arba“. Pavyzdžiui, kai kurių laukinių gyvūnų kailis žiemą pasidaro baltos spalvos. Savotiška himalajinių triušių spalva (ausys, nosis ir galūnės tamsios, kita kūno dalis balta) priklauso nuo temperatūros. Šios veislės triušių ląstelėse melaninas sintetinasi tik žemoje temperatūroje. Pažeminus temperatūrą, juodą plaukų spalvą galima gauti bet kurioje kūno vietoje, o auginami 30°C temperatūroje šie triušiai būna visiškai balti. Atsikišusių kūno dalių paviršius yra žemesnės temperatūros, todėl himalajinių triušių jos kaip tik ir yra pigmentuotos. Ir vienu, ir antru atveju požymis priklauso nuo temperatūros, bet reakcija į ją yra skirtinga: vienų gyvūnų žemoje temperatūroje slopinama melanino sintezė, kitų, atvirkščiai, ši medžiaga sintetinasi tik žemesnėje temperatūroje. Įvairių genotipų reakcija į tą patį aplinkos poveikį yra skirtinga.

Alternatyvūs fenotipai yra tam tikrų genų ypatybė.

Kaip tokie genai veikia ir kaip valdoma jų veikla, – ateities klausimai.

9.7. Žemesniųjų eukariotų požymių paveldėjimas ir rekombinacija

Tai labai įvairi pagal lytinį procesą (jo gali ir nebūti), rekombinaciją ir požymių paveldėjimą organizmų grupė, nevienalypė.

Grybai. Vienaląsčių grybų ląstelių branduoliuose nevyksta tokie sudėtingi reiškiniai kaip pirmuonių branduoliuose. Nepaisant didelės grybų įvairovės pagal nesuderinamumo tipus, lytinį procesą ir diplofazės–haplofazės kaitą, pasak S. Ingės-Večtomovo, iš maždaug 4200 grybų genčių ir 50000 rūšių genetiškai ištirta tik 30 rūšių, atstovaujančių 20 genčių. Tačiau, kaip ir pirmuonių, yra keletas grybų rūšių, kurios genetiškai ištirtos, galima teigti, idealiai, iki visiško genomo sekvenavimo.

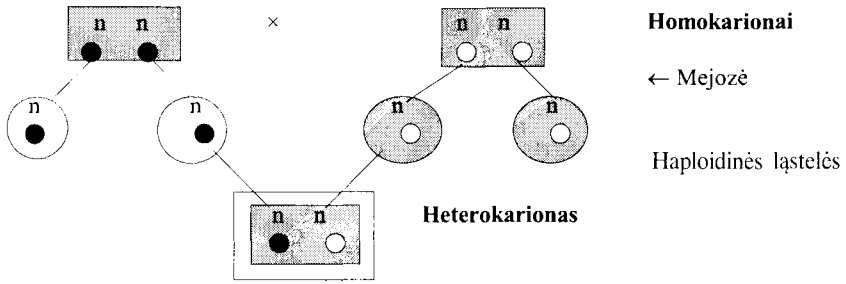
Pirmauja mielės *Saccharomyces cerevisiae*, kurių tyrimo rezultatus ne kartą nagrinėjome. Tai vienas pagrindinių objektų ląstelės ciklo

valdymui, chromosomų sandarai, mitozei, mejozei ir genetinei rekombinacijai tirti. Nagrinėjome šio objekto poravimosi tipų genetiką, kuriai būdinga savita genomo pertvarka. Pagaliau mielės, kaip genetinis objektas, įsitvirtino genų inžinerijoje ir genetinėje analizėje, naudojant dirbtinę mielių chromosomą YAC (žr. p. 173). Dirbtinių chromosomų konstravimas apskritai prasidėjo nuo *S. cerevisiae*. Į antrą vietą pagal ištirtumą gali varžytis *Schizosaccharomyces pombe* ir *Neurospora crassa*. Pirmasis objektas naudojamas tiems patiems reiškiniams, kaip ir *Saccharomyces cerevisiae* tirti, antrasis, *Neurospora crassa,* neprilygstamas dėl galimybės taikyti tetradinę analizę (žr. toliau). Kaip pramoniniai objektai genetiškai tiriami *Aspergillus, Penicillium* ir kitų genčių grybai – įvairių medžiagų, pirmiausia antibiotikų, gamintojai.

Grybų haplofazės–diplofazės kaita labai įvairi. Šiose organizmų grupėse gali būti 3 branduolio fazės: **haplofazė, diplofazė** ir **dikarionas**. *Saccharomyces* homotalinių mielių branduolys yra diploidinis, o mielių *Schizosaccharomyces* vyrauja haplofazė, bet retkarčiais diploidinis branduolys dalijasi ne mejoziniu, o mitoziniu būdu, dėl to susidaro diploidinės vegetatyvinės ląstelės. Grybų *Neurospora* vyrauja haplofazė, tuojau pat po apvaisinimo vyksta mejozė. Kartais, susiliejus dviem ląstelėms, jų branduoliai nesusilieja. Aukštesniųjų eukariotų tai trunka labai trumpai, kol susijungia vyriškas ir moteriškas branduoliai, o grybų **dikarionas gali sudaryti pagrindinę gyvenimo ciklo dalį**. Šiuo atžvilgiu net tos pačios genties grybai labai įvairūs, pvz., *Aspergillus,* ribose. Pasitaiko grybų su daugiabranduolėmis ląstelėmis.

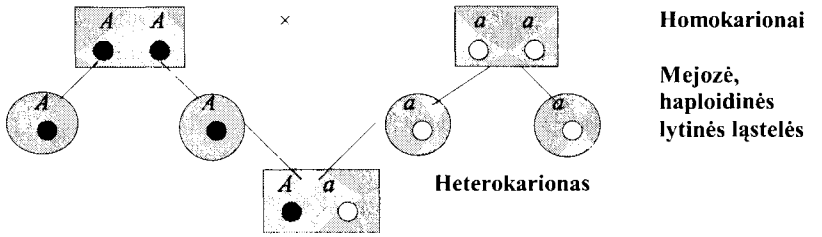
Dikarionas yra savita diploidiškumo užuomazga. Gali būti dvi jo genetinės būsenos: heterokarionas ir homokarionas.

Kai susilieja ląstelės su genetiškai tapačiais branduoliais, susidaro **homokarionas**, o kai su skirtingais – **heterokarionas**:

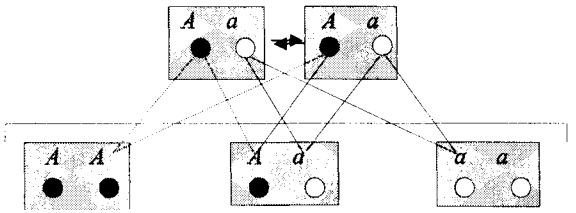


Tarp skirtinguose branduoliuose esančių genų būna tokia pati sąveika, kaip ir diploidiniame branduolyje (pvz., dominavimas, epistazė ir kt.). Tačiau heterokarione nehomologinės ir homologinės chromosomos negali derintis atsitiktinai. Kai dikarionas pereina į haplofazę, būtent susidarius haploidiniams *Penicillium chrysogenum, Aspergillus nidulans* konidijoms, į dukterines ląsteles patenka tik po vieną heterokariono branduolį, todėl **palikuonys skyla tik į dvi pradines (tėvines) grupes, nepasireiškia genetinė rekombinacija dėl laisvo chromosomų derinimosi.**

Susiliejus dviejų homokarionų lytinėms ląstelėms, aleliniai genai paveldimi taip:



Atsitiktinai susiderinus heterokarionų branduoliams, galima tikėtis trijų genotipų dukterinių ląstelių:



Daugiabranduoliuose heterokarionuose derinių skaičius didėja priklausomai nuo daugiabranduolės ląstelės branduolių genotipų ir bendro branduolių skaičiaus ląstelėje. Todėl daugiabranduoliuose heterokarionuose (pvz., *Aspergillus sojae, A. oryzae*) šis procesas gali būti labai įvairus ir sudėtingas priklausomai nuo to, kaip pasiskirsto branduoliai.

Tačiau dikariono branduoliai gali trumpam susilieti. Tada susidaro įvairūs chromosomų deriniai, vyksta krosingoveris, panašiai kaip aukštesniųjų eukariotų.

Lytinis procesas. Poravimosi (lytiniai) tipai. Pagal šiuos reiškinius irgi labai didelė grybų įvairovė. Kaip ir pirmuonių, lytinės ląstelės dažniausiai diferencijuojasi iš vegetatyvinių ląstelių.

Gali būti **homotaliniai ir heterotaliniai grybai.** Homotalinių grybų skirtingų poravimosi tipų lytinės ląstelės išsivysto iš to paties gniužulo (talomo), kaip *Saccharomyces cerevisiae* (žr. p. 219), po nedidelės genomo pertvarkos – *a* arba α kasetės translokacijos į *MAT* lokusą.

Homotalinius grybus galima prilyginti savidulkiams augalams (įvaisai).

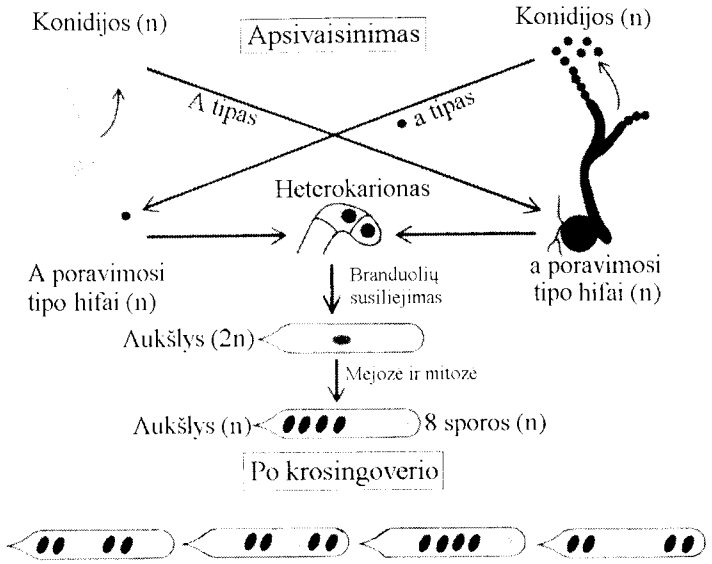
Heterotalinių grybų miceliai yra skirtingų poravimosi tipų. Juos galima prilyginti augalų kryžmadulkai (autbrydingui).

Tetradinė analizė. Tai patogus ir labai veiksmingas genetinės analizės metodas. Dabar jis taikomas įvairiems grybams ir dumbliams tirti, bet pirmiausia jį pritaikė apie 1930 m. Lindegrenas (K. Lindegren) grybui *Neurospora crassa*. Grybuose, kuriuose vyrauja haplontas, po lytinio apsivaisinimo vyksta mejozė, ir susidaro 4 haploidinės ląstelės, sulipusios į krūvelę – tetradą. Iš čia kilo tetradinės analizės pavadinimas. Kai kurių grybų sporos yra vaisiakūnyje – aukšlyje, todėl jos vadinamos **aukšliasporėmis**. Aukšlyje ląstelės gali 1–2 kartus dalytis papildomai mitoziniu būdu, ir tada jame susidaro ne 4, o 8 arba 16 sporų. Tai sisteminis grybų požymis. *Neurospora crassa* aukšlyje yra 8 sporos. *Saccharomyces cerevisiae* susidaro 4 sporos, bet jos išsidėsto kamuolėlio pavidalu, bendra grupe. Tokias tetradas sunkiau tirti negu *Neurospora* aukšliaspores.

Neurospora crassa turi didelį privalumą: šio grybo sporos aukšlyje išsirikiuoja viena eile ir, jeigu neįvyko sudėtingesnių įvykių (krosingoverio ar genų konversijos), pagal genotipus jos išsirikiuoja taip: 4 vieno genotipo, 4 kito genotipo (9.19 pav.). Kiekvieną aukšliasporę galima išimti ir pasodinti į atskirą mėgintuvėlį. **Individuali ląstelių genetinė analizė čia būna maksimali:** kiekvieną sporą ir iš jos išaugusių vegetatyvinių ląstelių kloną galima tirti atskirai. Po *Neurospora* monohibridinio kryžminimo iš vieno aukšlio gaunamos dvi genotipų ir fenotipų grupės santykiu 1:1. Tarkime, kad suliejamos lytinės ląstelės dviejų kamienų: vienas jų sintetina pirimidino bazę timiną (***thy***$^+$), kitas jo sintetinti nesugeba (***thy***$^-$):

P	***thy***$^+$ × ***thy***$^-$
Zigota	***thy***$^+$***thy***$^-$
Aukšlys/aukšliasporės	***thy***$^+$***thy***$^+$***thy***$^+$***thy***$^+$***thy***$^-$***thy***$^-$***thy***$^-$***thy***$^-$
	arba
	thy$^-$***thy***$^-$***thy***$^-$***thy***$^-$***thy***$^+$***thy***$^+$***thy***$^+$***thy***$^+$

Vadinasi, viename aukštyje pusė sporų yra vieno genotipo *thy*$^+$, pusė kito *thy*$^-$. Tuo galima įsitikinti pasodinus kiekvieną aukšliasporę



9.19 pav. ***Neurospora crassa*** **tetradinė analizė**

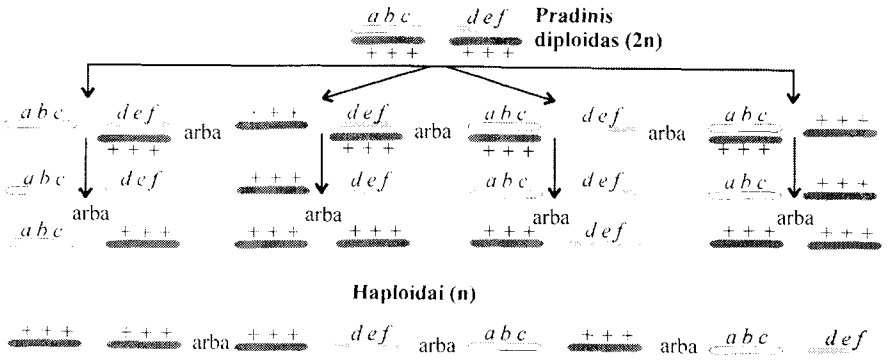
ant kietos terpės, kurioje nėra timino: iš pusės sporų nesusidarys vegetatyvinių ląstelių.

Bet koks sporų sekos pokytis yra naujas genetinis reiškinys – krosingoveris, genų konversija arba mutacija. Ypač patogu šiuos pokyčius stebėti sukryžminus dviejų kamienų skirtingos spalvos aukšliaspores. Kaip keičiasi sporų spalva aukšlyje po krosingoverio, pavaizduota 9.19 paveiksle.

Paraseksualinis procesas. Daugelio grybų gali susilieti vegetatyviniai hifai. Jeigu hifai skiriasi genetiškai, susidaro heterokarionas. Jis gali egzistuoti ilgą laiką, todėl juo naudojamasi, pvz., genų sąveikai tirti. Galima ją palyginti su genų sąveika heterozigotose. Tarp kitko, paaiškėjo, kad sąveika vis dėlto skiriasi.

Heterokariono branduoliai gali susilieti ir tada pasireiškia paraseksualinis procesas, kurį 1949 m. *Aspergillus* gentyje atrado Pontekorvas (G. Pontecorvo).

Paraseksualinis procesas yra mitozinė rekombinacija, ir šiuo atveju **haploidizacija** vyksta ypatingu būdu – neišsiskiriant atskiroms chromosomoms.



9.20 pav. **Haploidizacija – grybų paraseksualinis procesas**

Haploidizacija (haploidinių ląstelių susidarymas) vyksta mitozėje. Į vieną polių iš padvigubėjusios homologinių chromosomų poros patenka trys dukterinės chromosomos, o į kitą tik viena. Dukterinės ląstelės atitinkamai turi 2n+1 ir 2n–1 chromosomų. Jos genetiškai nesubalansuotos ir genetiškai nestabilios, todėl haploidizacija vyksta toliau, pakartotinai neišsiskiriant dukterinėms chromosomoms ir po truputį prarandant vieną chromosomų rinkinį, kol susidaro subalansuota haploidinė būsena. Haploidizacija tarp dviejų chromosomų porų pavaizduota 9.20 paveiksle. Kaip ir mejozėje, galimi 4 deriniai su sąlyga, kad tarp homologinių chromosomų nepasireiškia krosingoveris.

Grybų mitozinis krosingoveris toks pat, kaip ir aukštesniųjų eukariotų: vyksta mitozėje suartėjus dviem homologinėms chromosomoms. Tik aukštesniesiems eukariotams dėl mitozinio krosingoverio būdinga genotipinė, kartais ir fenotipinė mozaika, o grybų ir kitų vienaląsčių žemesniųjų eukariotų susidaro genetiškai grynas organizmas. Žinoma, mitozinis krosingoveris įmanomas tik diplofazėje. Po to gali vykti haploidizacija.

Dumbliai labai įvairūs, bet genetinei analizei jų naudojama labai nedaug. Daugiausia tyrimų atlikta su *Acetabularia*, *Chlamydomonas*. Tai haplobiontai. Susiliejus judrioms dviejų tipų „+“ ir „–“ gametoms, susidaro zigota. Jai subrendus, vyksta mejozė ir susidaro haploidinės sporos, taigi yra galima tetradinė analizė. Lytinės ląstelės „+“ ir „–“ morfologiškai nesiskiria ir turi normalų citoplazmos kiekį. Tai buvo pritaikyta nebranduoliniam paveldimumui tirti.

Genetiniams tyrimams naudojami ir agaminiai, neturintys lytinio proceso, dumbliai: *Euglena, Chlorella*. Pastaroji – dėl ypač produktyvios fotosintezės. Dumblių genetinė analizė anksčiau tebuvo mutantų tyrimai, o šiuo metu ji imta labai sparčiai plėtoti. Genetiniu atžvilgiu tai labai įdomi organizmų grupė. Ryškus perėjimas iš vienaląsčių dumblių per kolonijinius dumblius į daugialąsčius dumblius. Kai kurių vienaląsčių dumblių, kaip antai *Acetabularia*, labai sudėtinga ląstelės raida (žr. 1.1 pav.), kuri jau senokai domina genetikus.

X. GENETINĖS REKOMBINACIJOS MECHANIZMAI. GENŲ INŽINERIJA

10.1. Molekuliniai rekombinacijos mechanizmai

10.1.1. Rekombinacijos tipai. Saitspecifinė rekombinacija

Genetinė rekombinacija – visa apimantis reiškinys, būdingas visiems organizmams nuo virusų iki žinduolių, nuo reiškinių, kurie vyksta generatyvinėse ir somatinėse ląstelėse, iki organizmų populiacijų. Bendras tikslas – sukurti ir palaikyti polimorfizmą, įvairovę. Kiekviena organizmų grupė ir net konkrečios gentys turi savitų rekombinacijos reiškinių.

Pagrindiniai rekombinacijos tipai yra: homologinė ir saitspecifinė rekombinacija.

Homologinė, arba bendroji (arba reguliarioji), rekombinacija vyksta bet kurioje chromosomoje ir bet kurioje jos vietoje ir keičiamasi fragmentais tarp homologinių DNR molekulių arba jų sričių (krosingoveris, bakterijų bei virusų rekombinacija, genų konversija).

Saitspecifinė rekombinacija vyksta tik tam tikrose vietose, paprastai atpažįstant trumpas nukleotidų sekas (profago įsiterpimas į chromosomą, judrieji genomo elementai).

Visų rūšių rekombinacija yra genetiškai užprogramuota, nes

- yra speciali genomo sandara (nukleotidų sekos);
- rekombinaciją atlieka specialūs fermentai, kuriuos lemiantys genai yra kiekvieno organizmo genome.

Homologinė rekombinacija yra universaliausias ir svarbiausias rekombinacijos tipas. Išnaudojama bendra nukleorūgščių savybė sudaryti vandenilinius ryšius tarp dviejų komplementarių grandinių. Kartais bendroji rekombinacija vyksta ir tarp labai tolimų organizmų arba tarp to paties organizmo, bet skirtingų, nealelinių genų, jeigu šie turi homologinių DNR sekų.

Homologinė rekombinacija gali būti:

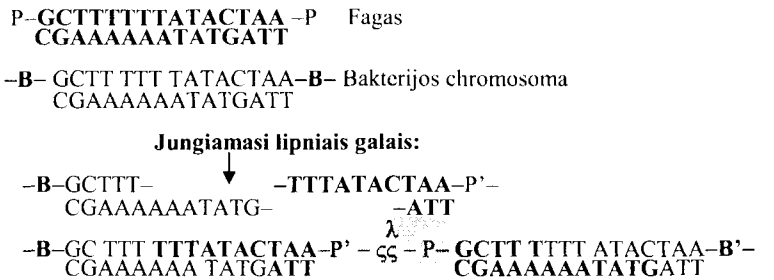
- **replikacinė** – pernešami vienagrandžiai DNR fragmentai, DNR pasipildo antrąja grandine replikacijos būdu. Taip vyksta bakterijų rekombinacija, dalyvaujant F veiksniui;

- **netaisyklinga**, arba **nedėsninga** – dėl jos atsiranda chromosomų ir genų mutacijos. Tai netolygus krosingoveris, klaidinga rekombinacinė reparacija, rekombinantinių sistemų sutrikimai ir klaidos. Ši grupė yra sąlyginė, nes klaidos gali būti daromos, kai vyksta bendroji bei saitspecifinė rekombinacija. Pagrindinis reiškinys – netolygus krosingoveris, kuris dažniausiai vyksta kartotinių sekų sankaupose.

Saitspecifinė rekombinacija. Pavadinimas kilęs nuo saito – nukleotidų sekos, vietos DNR, nes sąveika tarp įterpiamo (arba pašalinamo) segmento/genetinės struktūros ir „šeimininko"-taikinio vyksta trumpomis (netgi trumputėmis) homologinėmis sekomis. Jai būtinos trumputės homologinės sekos tiek įterpiamojoje struktūroje, tiek toje vietoje – taikinyje, kur ši struktūra įterpiama.

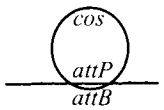
Pirmiausia aptikta ir smulkiai ištirta bakterijų nuosaikiojo fago λ saitspecifinė rekombinacija. Fagas turi seką *attP* (angl. *attachment of phage*), bakterija – *attB*. Vadinasi, fagas λ įsiterpia į bakterijos chromosomą griežtai nustatytoje vietoje. Kai bakterijos chromosomoje įvyksta *attB* delecija, šią seką pakeičia kitos, atsarginės *att*. Įsiterpimas į šias sekas neproduktyvus, atitinka tik 0,1% įsiterpimo į pagrindinę *att*.

Pagrindinėje *attP* ir bakterijos *attB* yra bendra (homologinė) seka O, o iš šonų skirtingi „pečiai", todėl ši fago seka užrašoma POP′, bakterijos – BOB′. Sąveika vyksta būtent šia vidine homologine seka. λ viruso ji atrodo taip:



Fago ir bakterijos DNR kerpama tose pačiose homologinėse sekose, todėl abiejų jų DNR jungiasi lipniais galais.

Tiek įsiterpimo, tiek šalinimo vietoje įterpiama-šalinama genetinė struktūra yra kilpoje:



10.1.2. Homologinė rekombinacija

Jos tyrimo pradininkas yra Morganas. Būtent jis ir jo bendradarbiai atrado krosingoverį – pagrindinį homologinės rekombinacijos tipą. Jis pasiūlė **„trūkio-susijungimo" teoriją: homologinėse chromosomose atsiranda trūkiai; jiems jungiantis susidaro sąlygos keistis segmentais tarp homologinių chromosomų.** Jis manė, kad apsikeičiama ištisais genais, arba kad genas yra krosingoverio vienetas. Manyta, kad Morganas klydo. Neseniai įsitikinta, kad jis teisus, tik šiuolaikinė geno samprata reikalauja patikslinti šį teiginį: **jeigu genas yra funkciškai dalijamas, apsikeičiama funkciniais vienetais** (žr. II sk.).

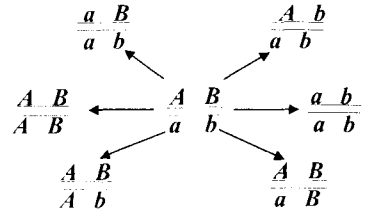
Genetikus imponavo puikūs, įtikinantys Benzerio bandymai, kuriais jis įrodė, kad bakteriofago T_4 *rII* rajono ribose du virusai gali apsikeisti tik viena nukleotidų pora. Tačiau nebuvo kreipiama dėmesio į du dalykus:

- Benzeris tyrė virusus, kurių homologinės rekombinacijos sąlygos visiškai kitokios negu eukariotų, kurių chromatino sandara ir genetinės medžiagos dalybos palikuonims itin sudėtingi reiškiniai;
- tyrimai atlikti tik vieno, nors sudėtingo lokuso ribose.

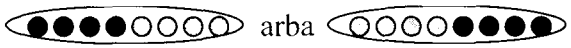
Po Morgano darbų buvo atrastas dar vienas reiškinys, kuris yra bendros kilmės su krosingoveriu. Tai geno konversija.

Geno konversija. 1930 m. vokiečių genetikas Vinkleris (H. Winkler) pasiūlė šį reiškinį kaip hipotezę kai kuriems augalų hibridų nukrypimams nuo įprasto paveldėjimo pobūdžio paaiškinti.

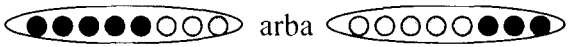
Geno konversija – tai vieno alelio virsmas kitu heterozigotose:



Tik 1949 m. Lindegrenas tetradinės analizės metodu įrodė šį reiškinį. Grybų *Neurospora crassa* aukšlyje gali būti neįprasti sporų santykiai: 5:3, 3:5, 3:1, 1:3. Šiais santykiais ir susidomėta. Įprastinis santykis, net esant krosingoveriui, yra 1:1, t. y. 4 sporos aukšlyje vienokios, ir 4 – kitokios, pvz.:

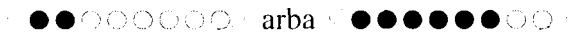


Kai santykis 5:3 arba 3:5, yra pomejozinė rekombinacija:



Ji įvyksta trečią, papildomą kartą, dalijantis būsimoms aukšliasporėms (du pirmieji dalijimaisi – I ir II mejozės).

Kai santykiai 6:2 arba 2:6, yra geno konversija:



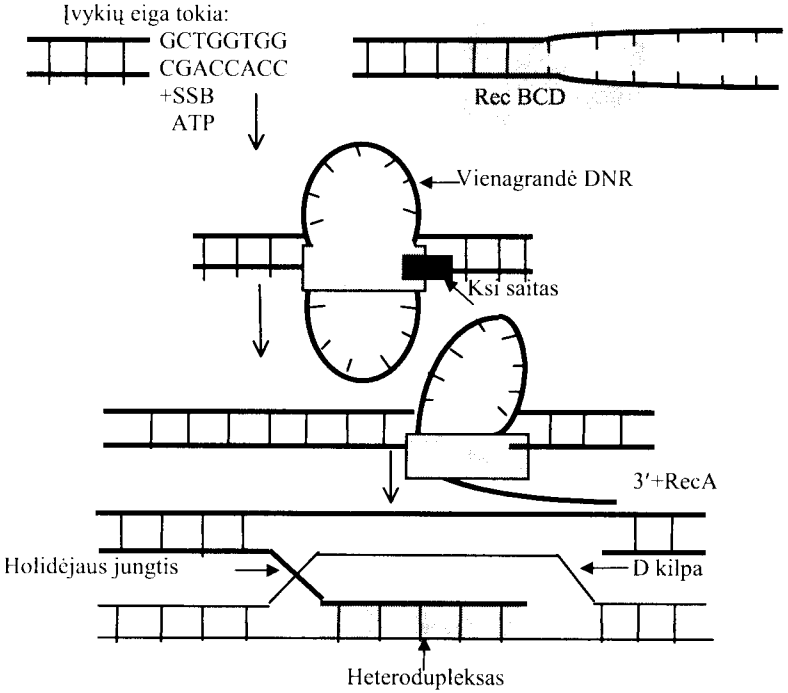
Tai lemia heteroduplekso korekcija (žr. toliau). Geno konversija, kaip ir krosingoveris, būdinga visiems organizmams, nes heteroduplekas susidaro visų organizmų DNR ir vyksta jo korekcija. Jis lemia virusų rekombinacijos poliškumą.

Bakterijų homologinė rekombinacija įtvirtino genetikoje naują požiūrį, kad homologinė rekombinacija yra paveldimas, genetinėje programoje numatytas reiškinys. Tai buvo įrodyta aptikus **rekombinacijos genus**, žymimus *rec* (*recA*, *recB*, *recC*...), ir nustačius, kokius baltymus jie koduoja ir kokia šių baltymų paskirtis. Taip pat buvo įrodyta, kad **DNR trūkis homologinei rekombinacijai būtinas**. Be to, yra ne vienas būdas trūkiams atsirasti. Juos atlieka skirtingos fermentų grupės, koduojamos skirtingų genų. Veiksmingiausiai bakterijų DNR kerpa Rec BCD kompleksas. Kerpama viena DNR grandinė. Kirpimo vietas nustato bakterijų genome specialios nukleotidų sekos, išsidėsčiusios kas 5–10 kb. Tai χ (ksi) saitai:

5′-GCTGGTGG-3′
3′-CGACCACC-5′

Rec BCD nukleazė prisijungia prie DNR ir juda iš dešinės ksi saito link. Judėdama ji, kaip helikazė, atskiria vieną DNR grandinę nuo kitos. Pasiekusi ksi saitą, ji kerpa vieną DNR grandinę (tarp 4–6 bazių). Trūkio vietoje turi būti 3′ galas. Vienagrandę DNR dalį stabilizuoja SSB baltymas. Vienagrandis DNR trūkis ir ATP aktyvina RecA baltymą, ir šis polimerizuojasi į vieną grandinę iš 6 RecA molekulių. Aktyvintas RecA baltymas atlieka du veiksmus:

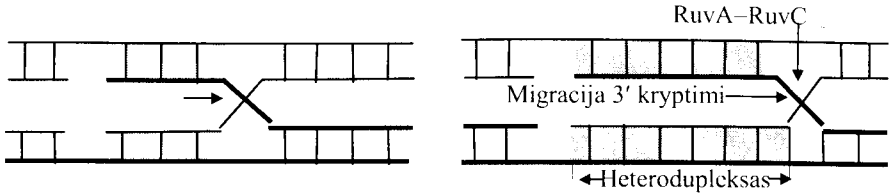
- kitoje DNR molekulėje padaro D kilpą (atknoja DNR grandinę),
- prisijungęs prie 3′ galo, perneša perkirptą DNR grandinę nuo vienos DNR molekulės ant kitos.



Šį bei tą teko „pasiskolinti“ iš eukariotų genetikos. Tai **Holidėjaus jungtis** (arba pirminis pavadinimas, dabar nevartojamas – Holidėjaus puschiazmis). Ją, kaip hipotezę, 1964 m. pasiūlė Holidėjus (R. A. Holliday), ištyręs grybo *Ustilago* rekombinantų ypatumus. Vėliau tokia jungtis tarp dviejų DNR molekulių buvo įrodyta.

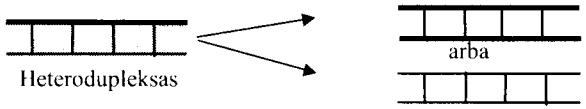
Šiuo rekombinacijos etapu svarbi genų *ruvA, ruvB, ruvC* koduojamų baltymų veikla:

- RuvB vykdo DNR grandinės migraciją, t. y. pertempia vis daugiau DNR nuo vienos DNR molekulės ant kitos; perkeltoji grandinė sudaro heteroduplekšą su recipiento DNR;
- RuvA pažįsta Holidėjaus jungtį;
- RuvC yra endonukleazė, perkerpanti Holidėjaus jungtį:



Holidėjaus jungtis gali būti šalinama ir kitu būdu. Dalyvauja kiti baltymai RecG ir Rus. Tačiau turi spręstis ir heteroduplekso likimas. Nors atrodytų, kad bakterijoms tai neaktualu, nes nėra tikrojo heterozigotiškumo, bet **heteroduplekse yra nesuporuotų nukleotidų**. Turi vykti **heteroduplekso korekcija** ir atstatytos tipiškos nukleotidų poros G ≡ C arba A = T. Ją atlieka minėtieji nesuporuotų nukleotidų reparacijos fermentai (MutH, MutS, MutL ir kt.). Prisiminkime išskirtinę heteroduplekso korekcijos ypatybę:

- ji nevaldoma, nukleotidas šalinamas atsitiktinai iš bet kurios DNR grandinės.

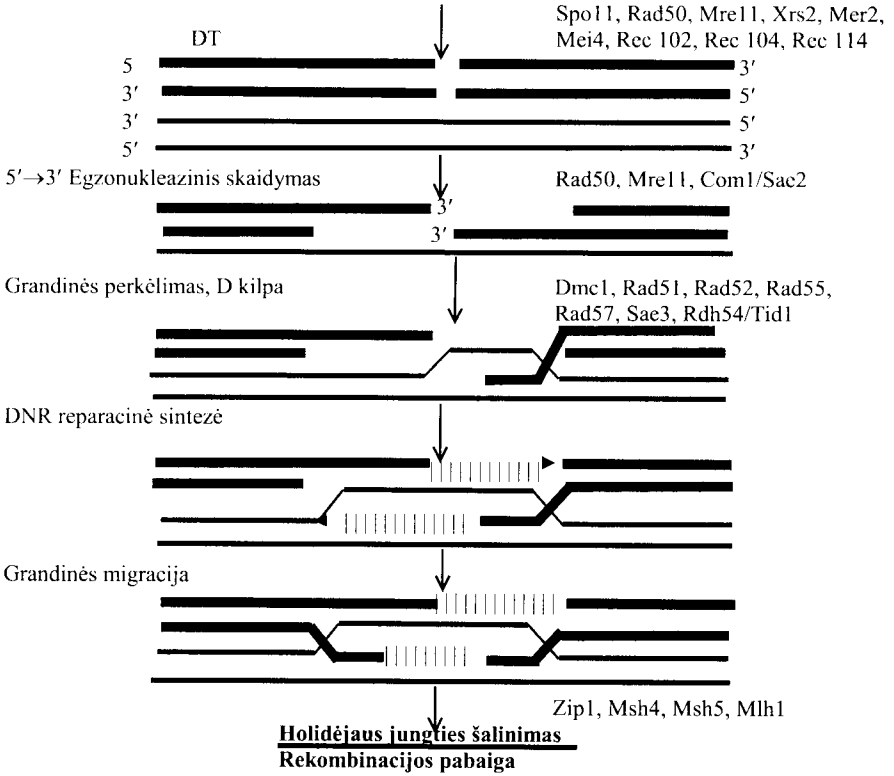


Štai todėl ir galimas dvejopas rezultatas:
- arba įvyko geno konversija,
- arba jos nėra.

Eukariotų homologinė rekombinacija – krosingoveris. Tai nepalyginti sudėtingesnis reiškinys. Nepaisant labai didelės pažangos pastaraisiais metais, galutinio taško padėti negalima. Šiuo metu labai gerai ištirta mielių *Sacharomyces cerevisiae* homologinė rekombinacija. Jau dabar aišku, kad žmogaus, drozofilos ir kitų aukštesniųjų eukariotų homologinė rekombinacija turi daug esminių skirtumų, susijusių su chromatino (ypač heterochromatino) sandara, ląstelės dalijimosi, lytinių ląstelių brendimo ir net apsivaisinimo skirtumais. Tačiau mielių homologinės rekombinacijos tyrimai formuoja naują požiūrį į šį reiškinį.

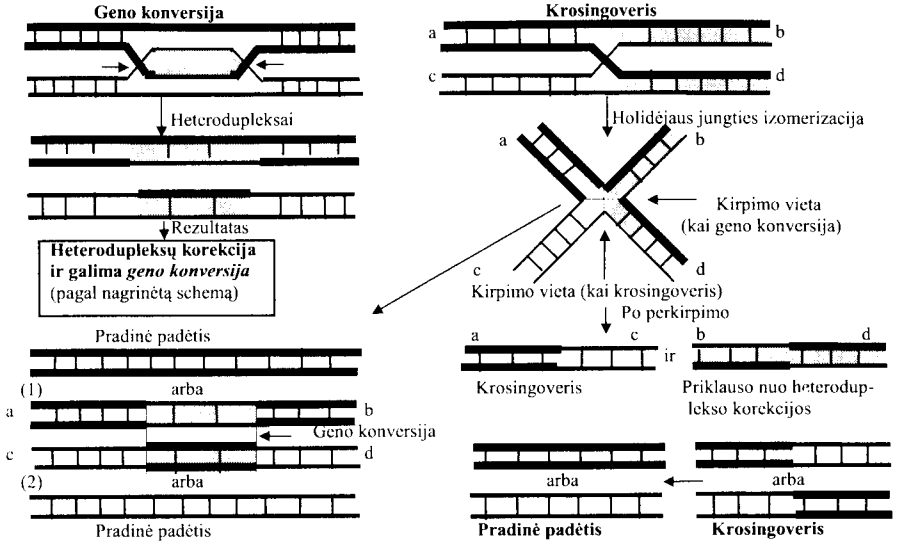
Dvigrandžiai, o ne vienagrandžiai trūkiai inicijuoja homologinę rekombinaciją.

Dvigrandžiai trūkiai (DT) ir homologinė rekombinacija. Dėl Holidėjaus ir jo darbų tęsėjų apie 15 metų manyta, kad homologinės eukariotų rekombinacijos pradžia yra vienagrandis DNR trūkis. Tai buvo priešprieša Morgano idėjai apie „trūkį ir susijungimą“, nes, pasak Morgano, turėtų būti chromatidžių trūkiai (t. y. dvigrandžiai DNR trūkiai). Kad DT yra konversijos ir krosingoverio pradžių pradžia, 1981 m. tokią mintį pareiškė amerikiečių mokslininkas Šostakas (J. W. Szostak), bet tik 1989 m. tai jam ir jo bendradarbiams pavyko įrodyti pagal mielių *Saccharomyces cerevisiae ARG4* geno konversiją. Per palyginti trumpą laiką buvo nustatyta, kad bent 9 genų mutacijos trukdo atsirasti DT, kurie būtini šiems vyksmams.



Vadinasi, rekombinacijos įvykių pabaigoje svarbūs 3 reiškiniai:

- **Holidėjaus jungčių šalinimas** – kaip bus kerpama jungtis;
- **izomerizacija**: molekulės (arba fragmentai) pasisuka vienas kito atžvilgiu 180°; be izomerizacijos nevyktų keitimasis vadinamaisiais flanginiais segmentais – nevyktų krosingoveris, o tik geno konversija, arba liktų pradinė padėtis;
- **heteroduplekso korekcija:**



Galutinis rezultatas yra trejopas:

- **pradinė padėtis** – be krosingoverio ir geno konversijos, heteroduplekso atstatomas į pradinę padėtį;
- **geno konversija** – vienas alelis virsta kitu;
- **krosingoveris** – apsikeičiama segmentais tarp homologinių chromosomų.

Tai priklauso nuo to, kaip yra ištaisomas heteroduplekso ir kerpama Holidėjaus jungtis.

Įvykių chronologija. Ją ištyrė Klekner (N. Kleckner) ir jos bendradarbiai (10.1 lentelė). Somatinėse ir priešmejozinėse ląstelėse homologinės chromosomos poruojasi daugybe tarpsaitinių ryšių („užkabinimais“). Jie išnyksta ląstelės ciklo S fazėje, bet homologinės chromosomos išlieka arti išsidėsčiusios. Prieš pat atsirandant DT vėl susidaro ryšiai tarp homologų. Šie įvykiai įvairiuose organizmuose vyksta skirtinga tvarka.

10.1 lentelė. **Mielių *Saccharomyces cerevisiae* mejozės ir krosingoverio įvykių chronologija** (pagal N.Kleckner, 1996)

Tyrimo lygis/būdas	Interfazė	Proleptotena	Leptotena	Zigotena	Pachitena	Diplotena
DNR	DNR replikacija	Homologų poravimasis	DT 15-30 min →		Holidėjaus jungtys **KR** ≥40 min **NKR**	
Elektroninė mikroskopija			Šoninių elementų užuomazgos	Šoninių elementų – SK susidarymas	SK visu ilgiu	Nykstantis SK
Šviesinė mikroskopija	Difuzinis chromatinas	Kompaktinis chromatinas	Plonos chromosomos	Storos chromosomos> „Puokštė"> Mazgeliai	„Dešrelės"	Išsilaisvinančios chromosomos

Laiko skalė:
Sferoplastai 2 3 4 5 6 7
Standartinės 1 2 3 4 5 6

sąlygos: DT – dvigrandžiai trūkiai; SK – sinaptoneminis kompleksas; KR – krosingoveris/krosoverai; NKR – be krosingoverio

Dauguma DT „karštų taškų" yra tarpgeninėse srityse. Matyt, teisus buvo Morganas manydamas, kad keičiamasi genais.

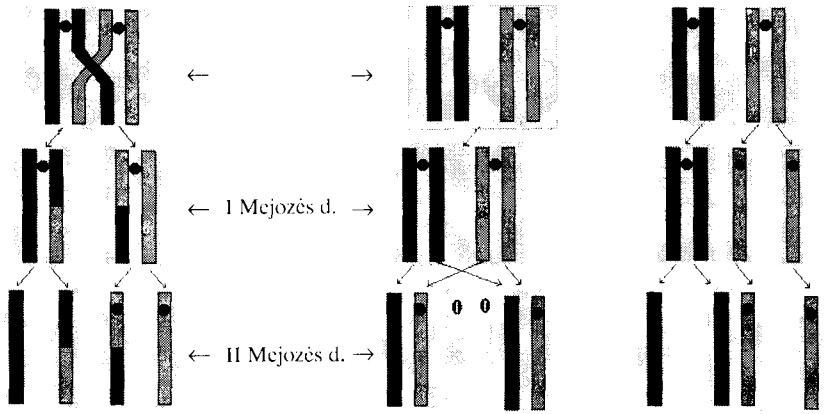
Schizasaccharomyces pombe DT „karštas taškas" yra nukleotidų seka
5′-ATGACGT-3′.

Prie jos jungiasi genų *mts1*/*mts2* koduojami baltymai, pažįstantys šias sekas. „Karštų taškų" dydis svyruoja 50–200 kb ribose, bet kiekvienam lokusui yra po „karštą tašką".

Taigi krosingoveris yra užprogramuotas.

DT atsiranda iki sinaptoneminio komplekso (SK). Klekner nustatė, kad tai įvyksta **leptotenos stadijoje**, o Holidėjaus jungtys sutampa su SK (10.1 lentelė). Rekombinacija pasibaigia pachitenos-diplotenos sandūroje. Pachitenoje vykstančią DNR sintezę atlieka nesuporuotų nukleotidų reparacijos fermentai.

Nustatyta, kad, blokavus krosingoverį, net jeigu po to vyksta achiazminė mejozė, netiksliai paskirstomos homologinės chromosomos ir **dažnesnė aneuploidija**. Rekombinacijos genų mutacijos gali lemti polinkį aneuploidijoms:



Krosingoveris
Normalios homologinių chromosomų dalybos/ keturios haploidinės ląstelės

Sutrikusios homologinių chromosomų dalybos
Per mejozės I dalijimąsi į vieną polių nuėjo bivalenta: dvi lytinės ląstelės n+1
dvi lytinės ląstelės n–1

Sutriko seserinių chromatidžių dalybos per mejozės II dalijimąsi

(pagal C. A. Bascom-Slack, L. O. Ross, D. S. Dawson, 1997)

Taigi ne vien achromatinės verpstės sutrikimai lemia aneuploidiją. Keitimasis flanginiais segmentais yra kur kas dažnesnis, negu jis nustatomas genetiškai. Jo negalima nustatyti, jeigu abiejose homologinėse chromosomose yra genetiškai visiškai tapatūs segmentai (homozigotos).

Nereikėtų stebėtis, kad krosingoveris valdo mejozę. Lytinis dauginimasis ir atsirado dėl galimybių keistis genetine medžiaga.

Šiuolaikiniais rekombinacijos tyrimais nustatyta keletas netikėtų, bet principinių reiškinių:

- DT yra būtini tiek normaliai mejozei, tiek rekombinacijai; sutrikus šiam etapui, nesusidaro sinaptoneminis kompleksas, vyksta achiazminė mejozė su daugybe klaidų arba ji visai nevyksta;
- homologinės rekombinacijos „karšti taškai", DT atsiradimo vietos, yra tarpuose tarp genų – beveik visi DT atsiranda tarpgeniniuose rajonuose;
- krosingoveris yra normali būsena, kuriai nesant nevyksta normali mejozė.

Homologinė rekombinacija priklauso nuo įvairių veiksnių (žr. „Krosingoveris"), tačiau kiekvienas taksonas, matyt, turi **optimalų**

rekombinacijos dažnį. Antai krosingoveris žmogaus genome apie 300 kartų retesnis negu mielių genome:

- mielių – 0,26 genolapio vieneto/kb,
- žmogaus – 0,0009 genolapio vieneto/kb.

10.2. Genų inžinerija

Gamtiniai būdai hibridinėms DNR molekulėms gauti. Jau turėjome pakankamai įtikinamų pavyzdžių, kad genų inžineriją, t. y. rekombinantinių DNR molekulių technologijas, pirmiausia sukūrė gamta, žmogus pakartotinai šias technologijas atrado (panašiai kaip de Fryzas, Korensas ir Čermakas – Mendelio dėsnius). Itin sudėtingu būdu vyksta jau nagrinėtos *Agrobacterium tumefaciens* Ti plazmidės T-DNR įsiterpimas į augalo genomą (žr. p. 244).

Vieną iš gamtinių būdų hibridinėms DNR molekulėms gauti tik ką nagrinėjome – tai homologinė rekombinacija. Tačiau jos galimybės ribotos – vieną alelį pakeisti kitu.

Saitspecifinė rekombinacija (plazmidės, nuosaikieji ir retro virusai), virusų moduliai gerokai praplečia šios natūralios genų inžinerijos ribas. Gali apsikeisti genais net labai tolimi mikroorganizmai (besidomintiems šiuo klausimu rekomenduotina R. B. Chesino „Nepostojanstvo genoma“, 1985; knygos autorius sunkiais lysenkizmo laikais yra dirbęs buv. Kauno medicinos institute).

Dirbtinės genų inžinerijos galimybės yra neribotos:

- galima perkelti iš vieno genomo į kitą tik tam tikrus konkrečius genus/nukleotidų sekas;
- prokariotų genus galima perkelti eukariotams, ir atvirkščiai;
- įterpti dirbtinai susintetintas nukleotidų sekas, kurių apskritai nebuvo genome, keisti vienus nukleotidus kitais arba juos šalinti.

Jau įprasta klonuoti eukariotų genus arba genomo fragmentus į bakterijų genomą. Taip bakterijos paverčiamos reikalingų produktų gamintojomis (producentais). Antai šitaip gaunamas augimo hormonas, interferonai ir kiti produktai, kurių gamtinės žaliavos brangios ir ribotos. Pirmasis žinduolių genas buvo klonuotas į bakterijų genomą 1978 m. Tai insulino genas.

1982 m. Palmiteris (R. Palmiter), Brinsternas (R. Brinstern) ir jų bendradarbiai pirmą kartą genų inžinerijos metodais perkėlė genus žinduoliams. Pelės milžinės, apkeliavusios daugelio knygų ir žurnalų viršelius, gautos tokiu būdu: į apvaisintų pelių kiaušialąsčių **vyriškąjį probranduolį** (kol vyriškasis ir moteriškasis probranduoliai nesusilieję ir juose yra po haploidinį chromosomų rinkinį) buvo įterpti augimo hormonų genai. Sėkmės atveju pelės kraujyje buvo 100–800 kartų daugiau augimo hormono negu normaliai.

Genų inžinerija yra kompleksas metodų:

- geno išskyrimo arba sintezės;
- būdų klonuoti geną į vektorių;
- vektorių kūrimo (atskira darbų kryptis);
- būdų įterpti vektorių su klonuotu DNR fragmentu į ląstelę ir į genomą;
- būdų, kaip pasiekti, kad perkeltas DNR fragmentas būtų veiklus (ekspresuojamas);
- atrankos metodų atpažinti ir atrinkti ląsteles, kuriose genų inžinerija sėkminga.

Genų išskyrimas ir sintezė. Pirmąjį geną (tiksliau, genų grupę) išskyrė 1969 m. Bekvitas, Šapira (J. R. Beckwith, J. Shapiro) su bendradarbiais. Tai buvo *Escherichia coli lac* operonas. Jis gautas pasinaudojus dviem virusais λ ir φ 80, kurie atlieka ribotą *E. coli lac* operono transdukciją. Šiuo metu reikalingų DNR sekų ieškoma genomų bibliotekose. Čia ypač praverčia cDNR bibliotekos.

Dirbtinė geno sintezė. Pirmąjį geną dirbtinai susintetino 1969 m. Korana (H. G. Khorana). Tai nedidelis, tik 77 nukleotidų porų mielių alanininės tRNR genas. Jis susintetintas cheminiais metodais pagal alanininės tRNR nukleotidų seką. Iš pradžių gautos nedidelės, 4–13 nukleotidų porų atkarpėlės, o jas sujungus, – visas genas. Tačiau jis buvo neveiklus, nes neturėjo valdymo sekų ir kitų normaliam genui veikti reikalingų sandaros elementų. Tik 1976 m. Koranai ir jo bendradarbiams pavyko dirbtinai susintetinti veiklų tirozininės tRNR geną, kuriame yra reikalingos valdymo sekos.

Esminė pažanga dirbtinai sintetinti genus įvyko tada, kai 1970 m. Teminas (H. M. Temin) ir Baltimoras (D. Baltimor) aptiko atvirkštinę transkriptazę. Šiuo fermentu genas sintetinamas be valdymo sekų,

bet jas vis tiek reikia specialiai prijungti priklausomai nuo organizmo, į kurio genomą bus perkeliamas genas.

Vektoriai – labai svarbus genų inžinerijos instrumentas. Apie plazmidžių vektorius jau rašyta (žr. p. 242).

> **Vektorius** (lot. *vector* – vežąs, nešąs) – tai priemonė, į kurią klonuojamas genas, t. y. svetima DNR, kad būtų galima ją pernešti į reikalingas ląsteles ir įterpti į jų genomą.

Pasinaudojama gamtoje esančiomis struktūromis. Genams įvesti į bakterijų ląsteles kaip vektoriai naudojami:

- bakteriofagai, ypač nuosaikieji;
- plazmidės ir jų dirbtiniai dariniai;
- judrieji genomo elementai.

Vektoriuje paliekami tie genai, kurie reikalingi įsiterpti į ląstelę ir į genomą. Plazmidės gali būti ir autonomiškos. Dažnai naudojamos daugiakopijinės plazmidės, nes klonuotas genas yra daug kartų pakartotas, todėl gaunamas didesnis geno produkto kiekis.

Retrovirusai naudojami kaip veiksmingi vektoriai DNR įterpti į žinduolių genomą. Augalų genų inžinerijoje dažniausiai naudojama Ti plazmidė iš *Agrobacterium tumefaciens*. Pastaruoju metu naudojamos ir dirbtinės konstrukcijos iš dviejų judriųjų genomo elementų. Pirmieji tokio tipo vektoriai yra sukurti drozofilai: tokio vektoriaus galuose yra po judrųjį genomo elementą, pvz., *P*. Jis atrodo taip:

—*P*–perkeliama DNR–*P*—

Iš esmės kiekvienas transpozonas, kurio galuose yra IS sekos – tokia pati konstrukcija. Ir aukščiau nurodyta PP konstrukcija pirmiausia aptikta drozofilos genome (*white* lokuse), o tik paskui pradėta dirbtinai konstruoti.

Vektoriai privalo turėti vietas (saitus), kuriuos pažįsta ir kerpa restriktazės. Dirbtinėje plazmidėje pBR 322 yra sekos, kurias atpažįsta ir kerpa daug skirtingų restriktazių. Be to, šioje plazmidėje yra genai, pagal kuriuos nustatoma, ar klonuojamasis DNR fragmentas įterptas į plazmidę, po to į „šeimininko“ ląstelę (žr. 3.48 pav.). Dirbtinėje plazmidėje pBR 322 – tai genai, lemiantys atsparumą antibiotikams ampicilinui ir tetraciklinui.

Iš dirbtinių vektorių būtina paminėti kosmides, „šatl“ vektorius ir priminti dirbtines chromosomas.

„Šatl“ vektoriai (angl. *shuttle* – šaudyklė, judėti pirmyn ir atgal; daugkartinio naudojimo – nusižiūrėta nuo kosminių laivų) sukonstruoti taip, kad gali būti naudojami DNR įterpti ir į bakterijų (*E. coli*), ir į mielių (*S. cerevisiae*) ląsteles.

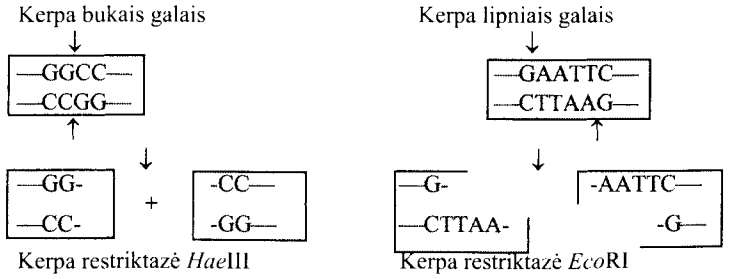
Kosmidės sukonstruotos λ viruso pagrindu. Tai plazmidės + λ viruso „hibridas“. Viruso λ paliekamas tik ribotas DNR kiekis – *cos* DNR seka. Ji lemia viruso DNR „supakavimą“ į baltyminį apvalkalą – kapsidą. Vektorius tampa veiksmingesnis, jeigu jo DNR yra viruso galvutėje (kapside). Tačiau visais minėtais vektoriais galima perkelti nedaug DNR. YAC ir kitomis dirbtinėmis chromosomomis galima perkelti labai didelius (iki ~ 300kb) DNR fragmentus. Jų taikymas kaip vektorių ir dirbtinių chromosomų konstravimas smulkiai išdėstytas (žr. p. 172).

DNR įvedimo būdas irgi labai svarbus. Pasinaudojama liposomomis – pūslelėmis iš dirbtinės membranos. Naudojamos kaip vezikulės (pernašos priemonė) įvesti į ląstelę įvairias medžiagas, tarp jų DNR ir ilgalaikes mRNR.

Rekombinantinės DNR gavimas. Restriktazės. Nuo restriktazių prasidėjo genų inžinerijos epocha. Restriktazių (lot. *restrictio* – apribojimas) savybės ne kartą minėtos. Bakterijų genome yra **restrikcijos-modifikacijos sistema**, kurios paskirtis – apsisaugoti nuo egzogeninės DNR, pirmiausia nuo virusų. Pati bakterijos DNR apsaugoma nuo suskaidymo restriktazėmis. Ji yra metilinama.

Restriktazės yra labai įvairios, skirstomos į 4 klases. Vieną jų (4-ąją) atrado A. Janulaitis ir jo bendradarbiai Biotechnologijos institute. Šis institutas yra vienas iš pasaulinių restriktazių tyrimo centrų. Jo kolekcijoje apie 200 restriktazių. Šiuo metu tiriama, kaip **restriktazė atpažįsta tas trumputes palindromines sekas, kurias ji kerpa abiejose DNR grandinėse**.

Pagal kirpimo pobūdį restriktazės yra dviejų tipų:



Pagal susitarimą restriktazės pavadinamos taip:

- pirmoji raidė nuo bakterijų genties, pvz., *Eco*RI – *Escherichia*,
- kitos dvi – pirmosios bakterijų rūšies pavadinimo raidės *coli* – **co,**
- R rodo, kad *E. coli* turi R veiksnį, o lotyniški skaitmenys – atradimo eiliškumą.

Hind III – *Haemophyllus influenzae*, d kamienas, III restriktazė.

Restriktazių yra daug, ir kiekviena jų pažįsta skirtingas palindromines sekas:

***Bam*HI** iš *Bacillus amyloliquefaciens* 5′—G↓G—A—T—C^{m}—C—3′
—C—C^{m}—T—A—A↑G—

***Alu*T** iš *Arthrobacter luteus* 5′—A↓G—C—T—3′
—T—C—G↑A—

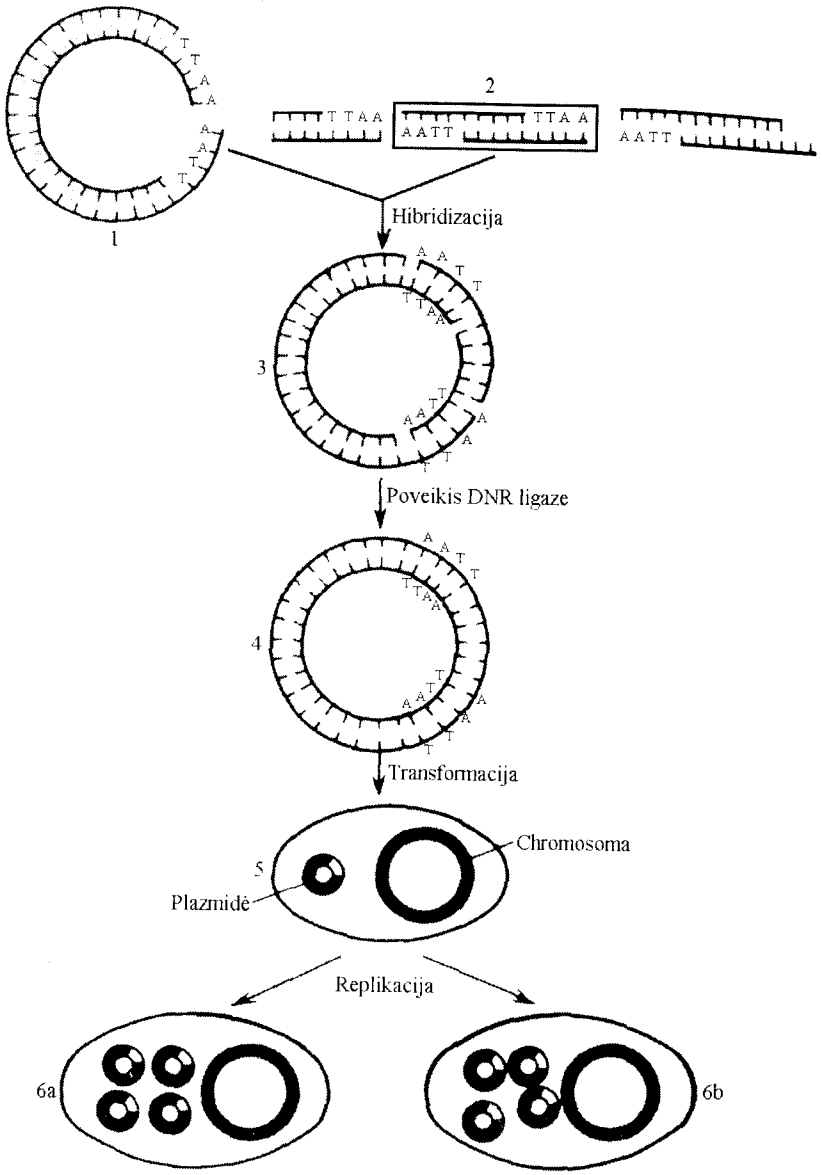
***Hind*III** iš *Haemophilus influenzae* 5′—A^{m}↓A—G—C—T—T—3′
—T—T—C—G—A↑A^{m}— ir kt.

Restriktazių įvairovė ir savitumas – bakterijų genomo strategija. Taip geriausia apsisaugoti nuo svetimos DNR.

Ir vektorius, ir į jį įterpiamas (klonuojamas) DNR fragmentas privalo turėti tuos pačius lipnius galus, t. y. turi kirpti ta pati restriktazė. Vienas su kitu jungiasi tik tie DNR fragmentai, kurie gauti panaudojus tą pačią restriktazę (10.1 pav.).

Transformuotų ląstelių atranka ir perkelto geno ekspresija. Tai ne mažiau, o gal ir daugiau pastangų reikalaujanti genų inžinerijos darbo dalis. Pernešamasis DNR fragmentas turi būti apsaugotas nuo ląstelės viduje esančių nukleazių, replikuotis, būti nesunkiai aptinkamas recipiento genome, pagaliau turi normaliai veikti svetimoje genų veiklos valdymo sistemoje.

Paprastai prie klonuojamojo geno prijungiamas ląstelės – būsimosios „šeimininkės“ kurio nors geno promotorius. Patogu naudotis indukuojamų genų promotoriais, žinduolių – kad ir metalotioneino. Tada klonuoto geno veiklą galima indukuoti, pvz., Zn^{2+} jonais. Kad eukariotų genai veiktų bakterijų ląstelėje, dažniausiai jie klonuojami į *lac* operoną šalia *lacZ*$^{+}$ geno. Tada perkelto geno veiklą galimą valdyti galaktozidais – *lac* operono induktoriais.



10.1 pav. **Genų inžinerija su plazmidiniu vektoriumi:**
1 – plazmidė pSC101 paveikta resriktaze; *2* – DNR, kurios fragmentas įterpiamas į plazmidę; *3, 4* – plazmidė su įterptu fragmentu; *5* – motininė ir (*6a, 6b*) dukterinės bakterijos ląstelės su įterptu DNR fragmentu; *6a, 6b* – plazmidės ląstelėje dauginasi nepriklausomai, todėl jų kopijų yra daugiau negu bakterijos chromosomos kopijų

Genas *lacZ*$^+$ veikia kaip **genas reporteris**. Genai reporteriai yra tokie genai, kurių veiklą lengva atsekti. Antai *lacZ*$^+$ geno, kuris koduoja β-galaktozidazę, substratas, sąveikaudamas su fermentu, nusidažo mėlynai. Genas reporteris prijungiamas prie klonuojamojo DNR fragmento. Genais reporteriais galima atsekti tas eukariotų ląsteles, kuriose yra veiklus tyrinėtoją dominantinis genas, pvz., iš *Hox* genų grupės. Visos ląstelės, kuriose veiks šis genas, dažysis mėlynai.

Kad būtų nesunku atskirti ląsteles po rekombinacijos, dažnai į vektorius įterpiami genai, kurių reiškimasis nustatomas selektyviomis terpėmis. Pavyzdžiui, galima įterpti genus, lemiančius atsparumą įvairiems antibiotikams. Sėkmingai reorganizavus genomą, ląstelė recipientė įgyja atsparumą antibiotikui ir išgyvena terpėje su normaliam ląstelių tipui mirtina antibiotiko koncentracija.

Kad patekęs į ląstelę recipientą vektorius galėtų autonomiškai replikuotis, jame turi būti ląstelei recipientui būdingas replikatorius (*ori*). Tik jį atpažįsta ląstelėje baltymai, atliekantys replikaciją.

Žinduolių genų inžinerija turi savitą problemą – į kokias ląsteles įvesti egzogeninę DNR. Kai norima gauti palikuonis su pakeistomis ypatybėmis, DNR įvedama **į apvaisintas kiaušialąstes prieš susiliejant probranduoliams**. Patirtis rodo, kad transformacija dažniausiai sėkmingesnė, jeigu svetima DNR įvedama į vyrišką pronukleusą.

Genoterapija. Genetikos pažanga atveria naujų galimybių gydyti paveldimas ligas. Viena jų – genoterapija. Labai daug triukšmaujama dėl tiesioginių planų keisti žmogaus vienus genus kitais, kaip ir dėl žmogaus ląstelės branduolio klonavimo. Tai realūs dalykai, bet nauda iš jų labai menka. Populiacijai jokios ypatingos reikšmės negali turėti. Tokios priemonės gali būti taikomos tik vienetams. Todėl ar ne paprasčiau asmeniui, kuris tikisi, kad jo palikuonys bus su paveldimu defektu, pasiieškoti sau tinkamos poros? Šiuo klausimu gali pagelbėti medicininė-genetinė konsultacija. Tačiau genoterapija realiai pritaikyta (ir tai galima atlikti daugeliui ligonių) somatinėse ląstelėse.

Somatinių ląstelių genoterapija. Kamieninių ląstelių genų inžinerija remiasi šių somatinių ląstelių savybėmis: 1) iš kamieninių ląstelių gaminasi, diferencijuojasi atitinkamo audinio ląstelės, pvz., iš kraujo čiulpų – limfocitai; 2) diferencijuota ląstelė dalijasi sudarydama kloną; 3) normalios ląstelės paprastai išstumia nenormalias, mutantines ląsteles. Šiuo metu genoterapija yra viena iš intensyviausiai plėtojamų medicininės genetikos sričių. Ji skirstoma į genoterapiją *ex vivo* ir *in vivo*:

- somatinių ląstelių genoterapija *ex vivo* atliekama taip: kamieninėje, pvz., limfocito, ląstelėje mutantinis genas pakeičiamas normaliu, ir tokia ląstelė „grąžinama“ atgal organizmui (šiuo atveju į kaulų čiulpus). Ląstelė dalijasi, ir pirmiausia susidaro normalių (pertvarkytų) ląstelių klonas. Realiausia ją atlikti asmenims, kuriems būtina kaulų čiulpų transplantacija. Tačiau ši genoterapijos kryptis susiduria su daug rimtų problemų (pvz., imuninio atsako), yra sunkiai atliekama ir brangi;
- somatinių ląstelių genoterapija *in vivo*. Šiuo metu vyraujanti kryptis. Naudojami įvairūs genų inžinerijos vektoriai, tarp jų virusiniai. Ypač perspektyvūs plazmidiniai vektoriai. Rekombinantinė DNR įvedama į specifines ląsteles, kurioms pasidalijus susidaro genetiškai modifikuotų ląstelių klonas.

Genų inžinerija gydymo sėkmę gali nulemti ir aplinkiniu būdu, per vaistų gamybą. Pokario metais didžiausias turtas buvo penicilinas arba streptomicinas. Sukūrus mikroorganizmų kamienus – antibiotikų gamintojus, šie vaistai tapo visiems prieinami. Lygiai tokia pati padėtis tokių brangių vaistų, kaip interferonai, augimo hormonai ir kt., gaminamų iš gamtinių žaliavų. Genų inžinerijos metodais yra sukurti mikroorganizmų kamienai, sintetinantys žmogaus biopolimerus: insuliną, interferoną, augimo hormonus, VIII veiksnį hemofilijai gydyti ir kt. Tačiau lygiai taip pat sėkmingai galima gydyti organizmą iš vidaus, perkėlus genus, koduojančius trūkstamų baltymų, pvz., augimo hormonų, sintezę.

Somatinių ląstelių genoterapija jau bandoma taikyti įvairiems paveldimiems defektams gydyti: fenilketonurijai, cistinei fibrozei, adenozindeaminazės defektui, hipercholesterolemijai, A hemofilijai, emfizemai, Diušeno raumenų distrofijai ir kt., taip pat imunitetui pakeisti (daug vilčių tokiu būdu sukurti atsparumą ŽIV). Bandoma tokiu būdu gydyti kai kurių tipų vėžį (melanomą ir kt.).

Augalų selekcija. Vilnius: Lietuvos mokslas, 1998. 16 kn.
Ayala F. J. Kiger J. A. Jr. *Modern Genetics*. 2-d ed. California, Davis: Benjamin/Cummings Publ. Co. 1984.
Avižonienė J. *Paveldimos nervų-raumenų ligos*. Vilnius: Mokslas, 1990.
Basys V., Sinkus A. *Paveldimos vaikų ligos*. Vilnius: Mokslas, 1979.
Becker W. M., Reece J. B., Poenie M. F. *The World of the Cell*. 3th ed. California, Davis: Benjamin/Cummings Publ. Co, 1996.
Bėčius K., Ganusevičiūtė L. *Selekcija ir sėklininkystė*. 2-as leid. Vilnius: Mintis, 1989.
Bražukas V., Sabataitienė G., Zabulionis V. *Evoliucijos ir genetikos pagrindai*. Konspektas. Vilnius: Žemės ūkio ministerija, 1980.
Breese F. L. *Regeneration and Multiplication of Germplasm Resources in Seed Genebanks: the Scientific Background*. Roma: IBPGR, 1989.
Bulavas J. *Bendroji augalų selekcija*. Vilnius: Mintis, 1970.
Catalogue of Lithuanian Plant Genetic Resources. Comp. A. Būdvytytė, J. Labokas, L. Balčiūnienė et al. Dotnuva-Akademija: Lith. State Sc. Stu. Foundation, 1997.
Collecting Plant Genetic Diversity. Ed. L. Guarino, V. R. Rao, R. Reid. Walingford (UK): CAB International. IBPGRI, 1995.
Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. Ed. V. e. A. Russo, R. A. Martinssen, A. D. Riggs. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.
Facets of Genetics. Select. A. M. Srb, R. D. Owen, R. S. Edgar. San Francisco: W. H. Freeman and Co, 1970.
Gimbutienė E. *Augalų genetika*. Kaunas: Spaudos fondas, 1939.
Griffiths A. J. F., Miller J. H., Suzuki D. T., Lewontin R. C., Gelbart W. M. An *Introduction to Genetic Analysis*. 7th ed. New York: Freeman and Co, 2000.
Hartl D. L., Jones E. W. *Genetics. Principles and Analysis*. 4th ed. Subdury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publ., 1998.
Ivanauskas T., Kanopka E., Venslauskas M. *Biologija*. Vilnius: Mintis, 1970.
Yčas M. *Apie biologiją*. Kaunas: Candela, 1994.
Juodka B. *Nukleino rūgščių chemijos ir biochemijos pagrindai*. Vilnius: Mokslas, 1988.
Kučinskas V. *Įvadas į žmogaus populiacinę genetiką*. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 1994.
Kučinskas V. *Tu ir Tavo genai*. Kaunas: Šviesa, 1998.
Lauko augalų selekcija Lietuvoje. Sudaryt. J. Lazauskas, R. Dapkus. Vilnius: Mokslas, 1992.
Lazutka J. *Molekulinė citogenetika*. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 1998.

Lekevičius R. *Ekologinė genetika*. Vilnius: Žinija, 1980.
Lelis J. *Paveldimos dermatozės ir sindromai*. Vilnius: Mokslas, 1981.
Lewin B. *Genes*. VII. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 2000.
Mader S. S. *Biologija*. Vilnius: Alma Littera, 1999. I kn.
Passarge E. *Color Atlas of Genetics*. New York: Thieme, 1995.
Pasternak J. J. *An Introduction to Human Molecular Genetics*. Oxford: Blackwell Sci, 1999.
Petrovas D. *Genetika ir žemės ūkis*. Vilnius: LKP CK leidykla, 1970.
Raff R. A., Kaufman T. C. *Embryos, Genes and Evolution*. New York–London: Macmillan Publ. Co, 1983.
Rančelis V. *Bendroji genetika*. Vilnius: Mokslas, 1986.
Rančelis V. *Eukariotų genetika*. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 1988.
Rudzinskas D. *Rinktiniai raštai*. Vilnius: Mokslas, 1977.
Sinkus A. *Įvadas į medicininę genetiką*. Kaunas: Kauno medicinos institutas, 1974.
Sinkus A. *Žmogaus chromosominės ligos*. Vilnius: Mokslas, 1989.
Ščerbakas J. *Černobylis*. Vilnius: Vyturys, 1990.
Vagonis Z., Meškauskas Č. *Gyvulių kraujo genetika*. Vilnius: Mintis, 1975.
Vogel F., Motulsky A. G. *Human Genetics*. 3th ed. Berein: Springer, 1996.
Weising K., Nybom H., Wolff K., Meyer W. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. New York–London–Tokyo: CRC Press, 1995.
Wolffe A. P. *Chromatin. Structure and Function*. 2d. ed. London: Acad. Press, 1995.
Žvingila D. *Organizmų homologinė rekombinacija*. Vilnius: Vilniaus universitetas, 1999.
Баршене И. *Кариотипы трематод*. Вильнюс: Изд-во энцикл. и научн. лит., 1993.
Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. *Клеточная инжинерия растений*. Киев: Наукова думка, 1984.
Жестяников В. Д. *Репарация ДНК и ее биологическое значение*. Ленинград: Наука, 1979.
Инге-Вечтомов С. Г. *Генетика с основами селекции*. Москва: Высшая школа, 1989.
Ичас М. *Генетический код*. Москва: Мир, 1971.
Картель Н. А., Макеева Е. Н., Мезенко А. М. *Генетика. Энциклопедический словарь*. Минск: Технология, 1999.
Лазутка Ю. *Сестринские хроматидные обмены*. Вильнюс: Изд. Вильнюсского университета, 1991.
Лекявичюс Р. К. *Химический мутагенез и загрязнение окружающей среды*. Вильнюс: Мокслас, 1983.
Ранчялис В. П. *Регуляция чувствительности высших растений к мутагенным факторам*. Вильнюс: Мокслас, 1978.

Слесаравичюс А. *Генетические методы в селекции злаковых трав.* Санкт-Петербург: Агропромиздат, 1992.
Сойфер В. Н. *Молекулярные механизмы мутагенеза.* Москва: Наука, 1969.
Сойфер В. Н. *Власть и наука. История разгрома генетики в СССР.* New York: Hermitage, 1989.
Тер-Аванесян М. Д., Инге-Вечтомов С. Г. *Генетический контроль синтеза белка.* Ленинград: Изд. Ленинградского университета, 1988.
Тератология человека. Под ред. Г. И. Лазюк. Москва: Медицина, 1991.
Хесин Р. Б. *Непостоянство генома.* Москва: Наука, 1985.
Янулайтис А. А. *Ферменты рестрикции и их применение.* Итоги науки и техники. Биотехнология. Москва: ВИНИТИ, 1989. Т. 17.
Яромоненко С. П. *Радиобиология человека и животных.* Москва: Высшая школа, 1988.

Vytautas Rančelis

Genetika

Vadovėlis aukštosioms mokykloms

Redaktorė Danutė Mėlynienė
Viršelio dailininkas Romas Dubonis

2000 12 12. 40 apsk. l. l. Tiražas 2500 egz.
Užsakymas Nr. 1313
Išleido Lietuvos mokslų akademijos leidykla
A. Goštauto 12, 2600 Vilnius
Spausdino AB spaustuvė „Spindulys“,
Gedimino g. 10, 3000 Kaunas
Kaina sutartinė